IMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ECDYSTERONBINDUNG AN CHROMOSOMEN VON DIPTEREN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

BERND DWORNICZAK

Bochum 1982

IMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ECDYSTERONBINDUNG AN CHROMOSOMEN VON DIPTEREN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

BERND DWORNICZAK

Bochum 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 1982

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. W. Kutzelnigg
1. Gutachter : Prof. Dr. O. Pongs
2. Gutachter : Prof. Dr. K.-D. Spindler

Ich bedanke mich bei allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere bei Prof. O. Pongs, Prof. K.-D. Spindler, Dr. H. Saumweber und Dr. H. Gronemeyer.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Bindung des Steroidhormons Ecdysteron an die verschiedenen Loci der Speicheldrüsenchromosomen von D. melanogaster während einer in vitro Simulation der Larvenentwicklung bis zur Ausbildung der Vorpuppe untersucht. Hierzu wurde das Ecdysteron durch eine Photoaktivierung mit dem spezifischen Rezeptor auf den polytänen Chromosomen quervernetzt und das Hormon anschließend mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenztechnik lokalisiert.

Für diese Ecdysteronbindung konnte nicht nur eine gute Korrelation mit den stadienspezifischen Puffmustern demonstriert werden, sondern es konnte auch gezeigt werden, daß das Ecdysteron eine positive, direkte Kontrolle über die Aktivität sowohl der Intermolt- als auch der "frühen" und "späten" Puffs ausübt. Da nachgewiesen werden konnte, daß die Aktivität der Intermoltpuffs, trotz einer sehr geringen Ecdysteronkonzentration, durch den Ecdysteron-Rezeptorkomplex kontrolliert wird und ein Absenken der exogenen Hormonkonzentration während der in vitro Inkubation von Speicheldrüsen nicht zur Dissoziation dieses Komplexes führt, sondern dieser zu anderen chromosomalen Loci transloziert, wird angenommen, daß das Hormon die Genaktivierung auch durch sekundäre, genomunabhängige Effekte beeinflußt.

Die schnellen Veränderungen der Hormonkonzentration modulieren diese sekundären Effekte und ermöglichen in Kooperation mit dem Steroid-Rezeptorkomplex und den regulatorischen Genprodukten der "frühen" Puffs die streng geordnete Abfolge der Genaktivierungen während der Entwicklung von D. melanogaster.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Experimenteller Teil
2.1. Larvenzucht
2.1.1. Oregon R-Wildtyp
2.1.2. ecd^1 Mutante
2.2. Sezieren von Speicheldrüsen
2.2.1. Geschlechtsbestimmung
2.3. Vorbereitung der Speicheldrüsen
2.3.1. Inkubation in der Gegenwart von Ecdysteron
2.3.2. Inkubation in Gegenwart von Ecdysteron und Actinomycin D
2.3.3. Auswaschexperimente
2.3.4. Reinitiation
2.3.5. Auswaschexperimente in Gegenwart von Cycloheximid
2.3.6. Untersuchung der Abhängigkeit der Ecdysteronbindung und der Puffstadienentwicklung vom Zeitpunkt der Belichtung ("Wanderungsexperimente")
2.4. Belichtung
2.4.1. Beschreibung der Belichtungsapparatur
2.5. Herstellung von Quetschpräparaten
2.5.1. Indirekte Immunofluoreszenz- und Phasenkontrast-mikroskopie
2.5.2. Mikroskopie und Fotographie
2.6. Optimierung der Belichtungszeit
2.7. Radioimmunologischer Vergleich zwischen belichtetem und unbelichtetem ^3H-Ecdysteron
2.8. Verwendete anti-Ecdysteron Seren
2.9. Monoklonale Antikörper
2.9.1. Immunisierung von Mäusen
2.9.2. Allgemeine Vorbemerkungen zur Zellkulturhaltung und Medienzusammensetzung

2.9.3. Zellfusion
2.9.4. Reklonierung
2.9.5. Aszites-Induktion in BALB/c-Mäusen
2.9.6. ELISA-Test

3. Resultate
3.1. Lichtinduzierte Umwandlung von Ecdysteron
3.1.1. Radioimmunologischer Vergleich zwischen belichtetem und unbelichtetem ^{3}H-Ecdysteron
3.2. Belichtungszeitoptimierung für Speicheldrüsen
3.3. Vergleich der Herstellung von Quetschpräparaten
3.4. Indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie
3.4.1. Spezifitätskriterien
3.5. Monoklonale Antikörper
3.6. Immunofluoreszenzmikroskopische Analysen der Ecdysteronbindung an Speicheldrüsenchromosomen von D. melanogaster
3.6.1. Chromosomale Bindungsmuster von Ecdysteron in den verschiedenen Entwicklungsstadien
3.6.2. Einfluß von Actinomycin D auf die Entwicklung von Speicheldrüsen
3.6.3. Auswirkungen des Ecdysteronentzug während der Speicheldrüsenentwicklung
3.6.3.1. Inkubation von PS1-Drüsen in ecdysteronfreiem Medium
3.6.3.2. Auswirkungen des Steroidentzugs nach vorausgehender Inkubation der Speicheldrüsen in Gegenwart von Ecdysteron
3.6.3.3. Reinitiation der Speicheldrüsenentwicklung
3.6.3.4. "Auswaschen" in Gegenwart von Cycloheximid
3.6.4. "Wanderungsexperiment"
3.6.5. Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse der D. melanogaster Mutante ecd^{1}

4. Diskussion

5. Literaturverzeichnis

ABKÜRZUNGEN UND TRIVIALNAMEN

DNA	: Deoxyribonukleinsäure
RNA	: Ribonukleinsäure
PS	: Puffstadium
IgG	: Immunoglobulin G
RIA	: Radioimmunotest
rpm	: Umdrehungen pro Minute
cpm	: Zählereignisse pro Minute
PBS	: Phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung
PBS/Azid	: Phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung
FITC-RAM	: Fluoreszeinisothiozyanat markiertes Kaninchen-anti-Maus IgG
FITC-GAR	: Fluoreszeinisothiozyanat markiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG
Ecdysteron	: 2β,3β,14α,20R,22R,25-hexahydroxy-5β-cholest-7-en-6-on
Ecdyson	: 2β,3β,14α,22R,25-pentahydroxy-5β-cholest-7-en-6-on
Ponasteron A	: 2β,3β,14α,20R,22R-pentahydroxy-5β-cholest-7-en-6-on
Cycloheximid	: 4-(2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl)-2,6-piperidindion

HERKUNFT DER VERWENDETEN SUBSTANZEN

Ecdysteron : Simes, Mailand
Actinomycin D : Calbiochem, Kalifornien
Cycloheximid : Boehringer, Mannheim
FITC-RAM : Miles-Yeda, Frankfurt/Main
FITC-GAR : Miles-Yeda, Frankfurt/Main

RAM konjugiert mit alkalischer Phosphatase : Miles-Yeda, Frankfurt/Main
Fötales Kälberserum : Boehringer, Mannheim
Plastikmaterialien für die Zellkulturhaltung: Greiner, Solingen

Alle anderen Chemikalien waren p.a. von den Firmen Merck, Serva und Baker.

Das ^{3}H-Ecdysteron wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Spindler zur Verfügung gestellt.

1. EINLEITUNG

Bei vielzelligen Organismen entstehen während der Entwicklung aus einer befruchteten Eizelle oder einer Spore als Ausgangszelle, durch viele aufeinanderfolgende Mitosen, größere Zellverbände. Hierbei treten Unterschiede auf, d. h. die ursprünglich genetisch gleichen Zellen verfolgen verschiedene Entwicklungswege und übernehmen später im Organismus sehr spezialisierte Funktionen (Differenzierung). Bei jeder einzelnen Zelle wird dieser Differenzierungsvorgang bestimmt von der koordinierten Aktivierung bzw. Inaktivierung der Gene, die auch verantwortlich ist für die korrekte Funktion der Zellen im ausgewachsenen Organismus.

Eines der wesentlichen Kontrollsysteme für die Koordination der eukaryotischen Genregulation, sowohl während der Differenzierung als auch während des normalen Zellzyklus, ist die Steuerung der Genaktivitäten durch Steroidhormone (1).

Trotz der großen Anzahl verschiedener Steroidhormone deuten die bisher bekannten Daten daraufhin, daß sie einen Teil ihrer Wirkung mit Hilfe sehr ähnlicher, molekularer Mechanismen erzielen. Nach der Ausschüttung in das Blut, werden die Hormone in den Zielzellen von hochspezifischen Rezeptorproteinen erkannt und gebunden. Der Steroid-Rezeptor-Komplex wird anschließend in eine chromatinbindende Form umgewandelt und geht eine enge Wechselwirkung mit dem Chromatin der Zelle ein (1-6). Die Vorgänge jedoch, die dann auf der Chromatinebene letztlich zur Genregulation führen, sind noch weitgehend unbekannt.

Für die Untersuchung dieser chromatingebundenen, molekularen Mechanismen bietet sich aus verschiedenen Gründen die Insektengruppe der Dipteren an:

- Die Entwicklung dieser Tiere vom Ei über die Larve bis zum adulten Organismus steht unter der Kontrolle der Juvenilhormone und der Ecdysteroide.
- Die Dipteren verfügen in einigen, hormonsensitiven Organen (z.B. Speicheldrüsen) über hochpolytäne Chromosomen, die mit einem normalen Mikroskop beobachtet werden können. Diese Organe können auch in einer in vitro Kultur gehalten werden.
- In vivo wird durch die Einwirkung von Ecdysteron in den Zellen dieser Organe eine Entwicklung initiiert, die aufgrund regelmäßiger, morphologischer Änderungen auf den polytänen Chromosomen (Puffausbildung, Puffregression) leicht verfolgt werden kann (7-13). Diese morphologischen Änderungen korrelieren mit Aktivitätsänderungen der entsprechenden Gene (14). Diese Entwicklung kann bis zum Ende des Larvenstadiums durch eine in vitro Inkubation der Speicheldrüsen in Gegenwart von Ecdysteron präzise nachvollzogen und durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen manipuliert werden (15-18).

Ausgehend von Untersuchungen dieser entwicklungsstadienabhängigen Änderungen der Puffverteilungsmuster auf den polytänen Chromosomen von Drosophila melanogaster wurde 1975 ein Modell der steroidabhängigen Genregulation in den Dipteren formuliert, das viele, bis dahin gemachte Beobachtungen umfaßte und erklärte (19). Eine wichtige Voraussetzung dieses Modells, nämlich die direkte Wechselwirkung des Ecdysterons mit dem Zellchromatin, konnte 1980 von Gronemeyer und Pongs bewiesen werden (20). Dies war möglich mit Hilfe der photochemischen Affinitätsmarkierung, bei der das Ecdysteron durch Bestrahlung an Komponenten der polytänen Chromosomen kovalent gebunden wurde. So wurde es erstmals möglich eine Puffausbildung direkt mit der Ecdysteronbindung an das Chromatin zu korrelieren und das steroidbindende Protein zu charakterisieren (21).

In der vorliegenden Arbeit wird die Bindung des Ecdysterons an Loci des Chromatins von Speicheldrüsenzellen während der Entwicklung der D. melanogaster Larve bis zur Ausbildung der Vorpuppe, aufgrund einer in vitro Simulation dieser Entwicklung, verfolgt. Weiterhin wird untersucht, wie die Chromatinbindung des Ecdysterons und das Verhalten des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes durch unterschiedliche in vitro Inkubationen beeinflußt werden kann. Anhand der Ergebnisse werden bestehende Regulationsmodelle überprüft und es wird eine, gegenüber den bisherigen Vorstellungen, erweiterte Arbeitshypothese für die steroidabhängige Genregulation in D. melanogaster formuliert.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Larvenzucht

2.1.1. Oregon R-Wildtyp

Für die meisten Experimente wurden Larven des Oregon R-Wildtypstammes von Drosophila melanogaster verwendet. Die Anzucht der Larven wurde in Zuchtgefäßen (220 ml) durchgeführt. Hierzu wurden diese etwa 2 cm hoch mit Eiablagemedium gefüllt und auf die Oberfläche einige Körnchen aktiver Hefe gestreut. 7 - 10 Fliegenpärchen wurden zur Eiablage für 24 Stunden in den vorbereiteten Gefäßen gehalten und diese, nach Umsetzen der Fliegen in neue Gefäße, in einen Wärmeschrank (25 °C) gestellt. Bei dieser Temperatur entwickeln sich die Larven des Oregon R-Wildtypstammes innerhalb von etwa 110 Stunden bis zum frühen dritten Häutungsstadium und verlassen dann das Medium.

Wenn die Anzahl der abgelegten Eier merklich nachließ (in der Regel nach 14 Tagen) wurden die Fliegen durch neue, 4 Tage alte Fliegenpärchen, ersetzt.

Eiablagemedium:

10	g	Oxoid Agar Nr. 3
50	g	Mehlweizen
50	g	Zucker
1	g	Nipagin M
40	ml	Melasse
1.000	ml	Wasser

2.1.2. ecd^1 Mutante

Für einige Kontrollexperimente wurden Larven einer Ecdysteronmutante von D. melanogaster verwendet. Diese Mutante ist bei

erhöhter Temperatur (29 °C) nicht in der Lage Ecdysteron zu synthetisieren und kann sich daher bei dieser Temperatur nicht zum adulten Tier entwickeln (22).

Zunächst wurden Fliegen des homozygoten Stammes in Zuchtgefäßen herangezogen und anschließend in große Populationskästen (22 l) umgesetzt (pro Kasten etwa 300 - 500 Fliegen). In die Käfige wurden Petrischalen (Ø 9 cm), gefüllt mit Eiablagemedium, gestellt. Alle 2 Stunden wurden diese Petrischalen mit den auf ihnen abgelegten Eiern durch neue ersetzt; ca. 12 - 14 Stunden später wurden die bereits geschlüpften Larven von den Petrischalen absortiert und verworfen. Anschließend wurden alle 2 Stunden die nun frisch geschlüpften Larven absortiert, in normale Zuchtgefäße umgesetzt und diese für 96 Stunden bei 20 °C gehalten. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die Larven bis zum frühen dritten Larvenstadium entwickelt und wurden nun bis zur Verwendung bei der nicht permissiven Temperatur von 29 °C gehalten. Bei dieser Temperatur können sich die Larven nicht verpuppen und verbleiben bis zu drei Wochen in dem dritten Larvenstadium. Dieser Umstand wurde auch als Kontrolle für die Reinheit des Stammes verwendet.

2.2. Sezieren von Speicheldrüsen

Für den größten Teil der Experimente wurden Speicheldrüsen von Larven des frühen dritten Stadiums verwendet. Hierzu wurden aus einem mit Larven gut bevölkerten Zuchtgefäß die größten, sich auf dem Medium rasch bewegenden, Larven zunächst in Wasser von Mediumresten frei gewaschen. Die Speicheldrüsen wurden in Grace's Medium (23), das mit destilliertem Wasser um 1/5 verdünnt worden war, unter einem Weitwinkelstereomikroskop (Typ DV 4, Zeiss) mit Hilfe einer Pinzette und einer Nadel seziert und von anhängenden Fettkörperresten befreit.

Für die Experimente wurden nur große, unverletzte Speicheldrüsen, die das charakteristische Aussehen einer Drüse des Puffstadiums 1 hatten (klare, durchsichtige Struktur, Einzelzellen zeichnen sich kugelig durch die Speicheldrüsenhülle ab) verwendet.

Für einige Kontrollexperimente wurden Larven eines späteren Entwicklungsstadiums benötigt. Hierzu wurden die Speicheldrüsen aus Tieren seziert, die bereits an der Wandung des Zuchtgefäßes saßen und, da sie auf das Berühren mit einer Pinzette nicht mehr reagierten, sich offensichtlich kurz vor der Entwicklung zur weißen Vorpuppe befanden. Die exakte Puffstadienbestimmung wurde dann anhand der Quetschpräparate der Speicheldrüsen gemacht.

2.2.1. Geschlechtsbestimmung

Nach dem Sezieren der Speicheldrüse wurde der restliche Fettkörper aus der Larvenhülle herausgedrückt und das Geschlecht des Tieres anhand der Form der Keimdrüsen, die in das Fettkörpergewebe eingebettet sind, bestimmt.

2.3. Vorbereitung der Speicheldrüsen

2.3.1. Inkubation in der Gegenwart von Ecdysteron (15)

Nach dem Sezieren der Speicheldrüse wurden diese einzeln in Grace's Medium (1/5 verdünnt mit Wasser, 5×10^{-6}M Ecdysteron) unterschiedlich lange inkubiert.
(Inkubationszeiten: 1,2,4 und 6 Stunden; Raumtemperatur)

Die Inkubation erfolgt in je 200 µl Flüssigkeit, die sich in der kreisrunden Vertiefung (Ø 2 cm) eines Objektträgers befand. Um ein Austrocknen der Flüssigkeit zu verhindern, wurde der Objektträger in einen, mit angefeuchtetem Filterpapier versehenen,

Plastikkasten gelegt.
Das exakte Puffstadium zum Beginn der Inkubation wurde mit Hilfe von Quetschpräparaten einer Hälfte der jeweiligen Speicheldrüse bestimmt.

2.3.2. Inkubation in Gegenwart von Ecdysteron und Actinomycin D (24)

Hierzu wurde eine Speicheldrüse halbiert und die eine Hälfte nur in Gegenwart von Ecdysteron (5×10^{-6}M) in Grace's Medium inkubiert, während die zweite Hälfte in Grace's Medium inkubiert wurde, dem außer Ecdysteron noch Actinomycin D (I. 2,57 µg/ml; II. 10 µg/ml) zugemischt war.
Ausgehend vom Puffstadium 1 bzw. Puffstadium 4 betrug die Inkubationszeit immer 2 Stunden.
Da Actinomycin D lichtempfindlich ist, wurde die Inkubation jedoch in der Dunkelheit durchgeführt.

2.3.3. Auswaschexperimente (18)

Hierzu wurden Speicheldrüsen des Puffstadiums 1 eine bzw. vier Stunden in Gegenwart von Ecdysteron inkubiert (siehe Abschn. 2.3.1.); anschließend wurden sie in ecdysteronfreies Grace's Medium (je 1 ml) überführt und für 2 bzw. 4 Stunden weiterinkubiert. Das Medium wurde halbstündig komplett ausgewechselt.

2.3.4. Reinitiation (18)

Speicheldrüsen, die, wie in Abschn. 2.3.3. beschrieben, 1 Stunde in Gegenwart von Ecdysteron und anschließend 2 Stunden in Abwesenheit von Ecdysteron inkubiert worden waren, wurden anschließend für eine weitere Stunde wieder in Gegenwart von Ecdysteron inkubiert (5×10^{-6}M Ecdysteron, 200 µl Medium).

Um den Verlauf der Inkubation zu kontrollieren, wurden nach jeder beendeten Inkubation Quetschpräparate von Referenzdrüsen angefertigt.

2.3.5. Auswaschexperiment in Gegenwart von Cycloheximid (18)

Die Experimente wurden, wie in Abschn. 2.3.3. beschrieben, durchgeführt, jedoch war allen Inkubationslösungen Cycloheximid (7×10^{-4} M) zugemischt.

2.3.6. Untersuchung der Abhängigkeit der Ecdysteronbindung und der Puffstadienentwicklung vom Zeitpunkt der Belichtung ("Wanderungsexperimente")

Hierzu wurden Speicheldrüsen direkt nach dem Sezieren 5 Min. belichtet und anschließend 2 Stunden in Grace's Medium (5×10^{-6} M Ecdysteron) inkubiert.

2.4. Belichtung

Die sezierten und je nach Experiment entsprechend vorbehandelten Speicheldrüsen wurden in einer kleinen Glasküvette bestrahlt. Die Glasküvette bestand aus einer 200 µl Einmalpipette, die an einem Ende zugeschmolzen und zu einer kleinen Kugel (Durchmesser ca. 5-7 mm) aufgeblasen war. Zur besseren Handhabung wurde die Pipette etwa 3 cm oberhalb der Kugel abgeschnitten und die Schnittkanten wurden feuerpoliert.

Mit Hilfe einer langen Pasteurpipette wurde die Küvette mit Grace's Medium oder frischer Inkubationslösung luftblasenfrei bis zur Einfüllöffnung gefüllt. Die Speicheldrüsen wurden dann mit einer Nadel auf die Flüssigkeitsoberfläche überführt und fielen, da sie etwas dichter als das Belichtungsmedium sind, durch den engen Hals auf den Grund der Küvette. Ein Anhaften

der Drüse an der Küvettenwandung wurde durch ein Rotieren der Küvette um die senkrechte Achse verhindert.

Zur Kühlung während der Belichtung wurde die Küvette in eine, mit Wasser gefüllte, 3 ml Quarzküvette gestellt, die von außen mit einem auf - 30 °C gekühlten Luftstrom angeblasen wurde. Hierdurch wurde erreicht, daß die Temperatur des Bestrahlungsmediums während der Belichtung etwa 15 - 20 °C betrug.

Belichtet wurde generell 5 Min. in 5 cm Abstand von der Lichtaustrittsöffnung des Lampengehäuses.

2.4.1. Beschreibung der Bestrahlungsapparatur

Die Bestrahlungsapparatur besteht aus einer Quecksilberdampf--Kurzbogenlampe (HBO 500 W/2), die in ein Lampengehäuse der Fa. Oriel montiert ist.

An der Lichtaustrittsöffnung des Lampengehäuses ist ein 1 mm dicker Kantenfilter (WG 320, Schott, Mainz) zur Ausfilterung des UV-Lichtanteils montiert. Die Transmission des Filters bei 320 nm beträgt 80 %. Bei Verwendung dieses Filters betrug die, mit einer Thermosäule gemessene, Leistung der Lampe in 5 cm Abstand von der Lichtaustrittsöffnung etwa 3.6 Watt/cm^2 (Wellenlängebereich: 320 nm - 13 µm).

2.5. Herstellung von Quetschpräparaten

Nach der Belichtung wurden die Speicheldrüsen sofort für die Quetschpräparate vorbereitet. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Fixiermethoden angewendet.

a) Zunächst wurde die Speicheldrüse 1 Min. in einer 1 %-igen Triton X-100-Lösung (in PBS) inkubiert und dann in einem 15 - 16 µl großen Tropfen Lösung (3,6 % säurefreier Formaldehyd, 45 % Essigsäure, Wasser), der sich auf einem Deckglas be-

fand, überführt und hier eine weitere Minute fixiert (25).

b) Die Speicheldrüse wurde zuerst in einer frisch angesetzten Mischung aus 75 % Äthanol und 25 % Essigsäure 1 Min. vorinkubiert und anschließend in einem Tropfen (15 - 16 µl) 45 % Essigsäure, 10 mM $MgCl_2$ 5 Min. fixiert (26, 27).

Alle weiteren Schritte bei der Herstellung der Quetschpräparate waren bei beiden Fixiermethoden völlig identisch.

Nach dem Fixieren wurde auf das Deckglas mit der Speicheldrüse und dem Tropfen Fixierlösung ein Objektträger aufgelegt und durch Schütteln des Objektträgers das Deckglas horizontal hin und her bewegt. Durch diesen Vorgang wurden die Zellen und die Zellkerne durch die auftretenden Scherkräfte zerrissen und die Chromosomen der Drüse freigelegt.
Durch vorsichtiges Klopfen mit einer abgestumpften Nadel auf das Deckglas wird nun das Cytoplasma weitgehend verdrängt und abschließend, durch vorsichtigen Daumendruck auf den umgedrehten Objektträger, das Chromosomenpräparat in eine Ebene gedrückt.

2.5.1. Indirekte Immunofluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie (25, 27)

Nach dem Quetschen der Chromosomenpräparate wurden diese kurz in flüssigen Stickstoff getaucht, das Deckglas mit Hilfe einer Rasierklinge abgesprengt und die Position des Quetschpräparates mit einem Glasschreiber auf dem Objektträger markiert.

Zum Nachfixieren wurden nun die Präparate 20 Min. in 95 %-igem Äthanol inkubiert und anschließend zweimal je 15 Min. in PBS gewaschen.
Zur Inkubation mit dem Primärantikörper gegen Ecdysteron wurden 20 µl der antikörperhaltigen Lösung auf ein Deckglas gegeben und die Objektträger mit der Chromosomenpräparation auf das Deckglas aufgelegt. So entstand zwischen Deckglas und Objektträger ein

dünner anti-Ecdysteron-Antikörper enthaltender Flüssigkeitsfilm. Zur Inkubation (30 Min., Raumtemperatur) wurden nun die Präparate in einen, mit angefeuchtetem Filterpapier versehenen, Plastikkasten gelegt.
Nach Beendigung der Inkubation wurde das Deckglas in PBS abgeschwemmt und das Präparat zweimal je 15 Min. in PBS gewaschen.

Die Inkubation mit dem FITC markierten Sekundärantikörper (je nach Art des verwendeten Primärantikörpers: FITC-RAM oder FITC-GAR) erfolgte ebenfalls in der oben beschriebenen Weise.
Die Stammlösung des FITC markierten Antikörpers wurden kurz vor Gebrauch 1 : 30 mit PBS/Azid verdünnt.
Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsgänge mit dem FITC-Antikörper in einem abgedunkelten Raum ausgeführt.

Nach Beendigung der zweiten Inkubation wurden die Präparate erneut zweimal je 15 Min. in PBS gewaschen und nach Benetzen mit einem Tropfen 1M Tris-HCl pH 8/Glyzerin (1 : 9) mit einem Deckglas abgedeckt. Das Deckglas wurde vorsichtig angedrückt und abschließend das Präparat mit einem mit Alkohol befeuchteten Filterpapier gereinigt. Diese so vorbereiteten Präparate können ohne signifikante Fluoreszenzausbleichung längere Zeit in der Dunkelheit bei - 20 ^{o}C gelagert werden.

Nach der mikroskopischen Untersuchung und fotographischen Dokumentation der fluoreszenztragenden Chromosomenpräparate wurden diese für die Aufnahme des Phasenkontrastfotos vorbereitet. Hierzu wurde zunächst das Deckglas in PBS abgeschwemmt und das anhaftende Glyzerin/Tris-HCl-Gemisch in PBS 5 Min. abgewaschen. Anschließend wurden die Präparate 2 - 5 Min. mit einem Anfärbereagenz (1 % Orcein in 50 % Milchsäure, 50 % Essigsäure) angefärbt und der überschüssige Farbstoff dann in 50 % Milchsäure, 50 % Essigsäure wieder entfernt (26). Dann wurden die Präparate in der Entfärbelösung eingebettet, mit einem Deckglas verschlossen und nach leichtem Andrücken des Deckglases und Reinigung des

Präparates die Deckglasränder mit Nagellack bestrichen. Auf diese Weise waren die Präparate gegen das Austrocknen geschützt und konnten für mehrere Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, ohne daß sich die Morphologie der Chromosomen änderte.

2.5.2. Mikroskopie und Fotographie

Die mikroskopischen Untersuchungen und fotographischen Aufnahmen wurden an einem Mikroskop, ausgerüstet für Phasenkontrast- und Auflichtfluoreszenzmikroskopie durchgeführt (Standard 18, Zeiss, Köln).

Fluoreszenzmikroskopie

Die optische Einrichtung bestand aus einem 25/0.8 W-Oel/korrigiertem Planobjektiv (Neofluare, Zeiss) und einem 10-fach vergrößerndem Okularsatz (Kompensations-Plan-Okulare, Zeiss). Fotographiert wurde durch einen aufsetzbaren Phototubus mit einer Kleinbildkamera.
(12,5-fach vergrößerndes Photookular; Kamerafaktor : 0,5)
Aus der Kombination der verwendeten Linsen ergab sich beim Fotographieren eine 156-fache Vergrößerung des Chromosomenpräparates auf dem Filmnegativ.
Das Filmmaterial waren immer Ilford HP 5 Filme (27 DIN).
Zur internen Standardisierung betrug die Belichtungszeit bei allen Präparaten 30 Sekunden.

Phasenkontrastmikroskopie

Hier standen folgende Objektive zur Verfügung:

- 16/0,4 (Neofluare, Zeiss)
- 25/0,8 W-Oel/Korr. (Planobjektiv, Neofluare, Zeiss)
- 40/0,75 (Neofluare, Zeiss)
- 63/1,4 Oel (Planapochromate, Zeiss)

Der Okularsatz vergrößerte wiederum 10-fach.

Fotographiert wurde generell mit dem 63-fach vergrößernden Objektiv und einem 8-fach vergrößernden Fotookular. In Kombination mit dem Kamerafaktor 0,5 der verwendeten Kleinbildkamera ergab sich so eine 252-fache Vergrößerung der Präparate auf dem Filmnegativ.
Das Filmmaterial waren Agfa-Orhto 25 Filme (15 DIN). Bei allen Phasenkontrastaufnahmen war die Belichtungszeit 4 Sekunden.

Nach dem Entwickeln der Filme wurden die Fotos auf hochglänzendem Fotopapier (Ilford) abgezogen. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden in der Regel Papiere des Härtegrades 4, für die Phasenkontrastaufnahmen Papiere des Härtegrades 2, verwendet. Zur Auswertung wurden die unterschiedlichen Vergrößerungsmaßstäbe der Chromosomenpräparate auf den Fotonegativen durch unterschiedliches Nachvergrößern einander angeglichen und die fluoreszenztragenden Banden auf den Phasenkontrastaufnahmen markiert. Hierzu wurde das Negativ der Fluoreszenzaufnahmen auf das Positiv der Phasenkontrastaufnahme projiziert. Dies ermöglichte eine eindeutige Bestimmung der fluoreszenztragenden Chromosomenorte.

2.6. Optimierung der Belichtungszeit

Um die minimale, jedoch für die anschließende immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung ausreichende, Belichtungsdauer der Speicheldrüsen herauszufinden, wurden Speicheldrüsen des selben Entwicklungszeitpunktes seziert und, unter sonst identischen Bedingungen, unterschiedlich lange belichtet (Belichtungszeiten: 1,2,5,10,20 und 30 Min.).
Die Quetschpräparate der Speicheldrüsen wurden anschließend immunofluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Um herauszufinden, ob die Belichtung in dem Ecdysteronmolekül eine Veränderung hervorruft, wurden folgende Lösungen unter-

schiedlich lange bestrahlt:

a) 10^{-3}M Ecdysteron in Äthanol
b) 10^{-3}M Ecdysteron, 1 % BSA in Wasser

In kurzen Zeitabständen wurden während der Belichtung Proben entnommen, die anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht wurden. Als Referenz diente jeweils nicht bestrahltes Ecdysteron.
(Laufmittel/ Aceton/Dichlormethan/Wasser: 62,5/15/10
Dünnschichtplatte: Polygram SIL G/UV_{254}-Fertigfolien)

2.7. Radioimmunologischer Vergleich zwischen belichtetem und unbelichtetem ^{3}H-Ecdysteron

Es wurde untersucht, ob belichtetes und unbelichtetes ^{3}H-Ecdysteron unterschiedliche Antigenizität gegenüber dem für die immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendeten anti-Ecdysteron-Kaninchenserum aufweist.

Hierzu wurde das ^{3}H-Ecdysteron zunächst 15 Min. belichtet und dünnschichtchromatographisch analysiert. Eine Verdünnungsreihe des anti-Ecdysteron-Kaninchenserums in PBS (die Proteinkonzentration wurde durch Zugabe von Kaninchennormalserum konstant gehalten) wurde 1 Stunde bei 37 °C mit dem belichteten ^{3}H-Ecdysteron inkubiert (Gesamttestvolumen 200 µl). Danach wurden pro Testansatz 50 µl Aktivkohle-Dextran-Suspension zugegeben (32, 33), um das nicht an Antikörpern gebundene Steroid zu adsorbieren. Nach 5 Min. wurden die Ansätze 5 - 10 Min. zentrifugiert und die in je 100 µl Überstand verbliebene Radioaktivitätsmenge bestimmt (Scintillatorflüssigkeit: Quickszint 372, Zinsser; Flüssigkeits-Scintillationszähler: Beckmann LS 9000). Zum Vergleich wurde eine identische Meßreihe mit der gleichen Menge unbelichteten ^{3}H-Ecdysterons durchgeführt.

2.8. Verwendete anti-Ecdysteron Seren

Sämtliche immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden mit einem anti-Ecdysteron antikörperhaltigen Kaninchenserum gemacht, das von Dr. H. Gronemeyer hergestellt worden ist. Hierzu hatte er ein Ecdysteron-Thyroglobulin-Konjugat verwendet. Die genaue Herstellung und Charakterisierung des verwendeten Serums entnehme man seiner Doktorarbeit (27).

Dieses Serum wurde jeweils kurz vor der Verwendung 1:5 mit PBS/Azid verdünnt.

Einige Kontrollexperimente wurden mit einem Kaninchenserum gemacht, das von Dr. J. Koolman zur Verfügung gestellt wurde und von ihm ausführlich charakterisiert worden ist (28). Auch dieses Serum wurde jeweils kurz vor der Verwendung 1:5 mit PBS/Azid verdünnt.
Weiterhin wurde versucht ein monoklonales Serum gegen Ecdysteron zu gewinnen. Die antikörperhaltigen Flüssigkeiten wurden je nach Ursprung (Zellkulturüberstände, Aszites) bis zu 1:100 mit PBS/Azid verdünnt.

2.9. Monoklonale Antikörper

2.9.1. Immunisierung von Mäusen

Drei ca. 6 - 8 Wochen alten BALB/c-Mäusen wurde eine Emulsion, bestehend aus 100 µg Ecdysteron-Hämocyanin-Konjugat (gelöst in PBS) und komplettem Freud's Adjuvant, subkutan an mehreren Stellen injiziert. Das Konjugat (Modifikationsgrad: etwa 100 Moleküle Ecdysteron pro Molekül Hämocyanin) stellte freundlicherweise Herr Prof. Spindler zur Verfügung.
Die Immunisierung wurde in Abständen von je 6 Wochen zweimal wiederholt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und dieses auf den Gehalt an Anti-

körpern gegen Ecdysteron hin untersucht (Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Chromosomenquetschpräparaten, die mit dem Serum der Mäuse und einem FITC gekoppelten anti-Maus-Antikörper inkubiert waren). Der Maus, die die beste spezifische Immunantwort zeigte, wurde 4 Tage vor der Milzentnahme und anschließender Fusion, eine Emulsion, bestehend aus 50 µg Ecdysteron-Hämocyanin-Konjugat und inkomplettem Freud's Adjuvant, intraperitonal injiziert.

2.9.2. Allgemeine Vorbemerkungen zur Zellkulturhaltung und Medienzusammensetzung

Die Zellkultur wurde generell bei 37 °C in einem CO_2-Inkubator mit 7,5 % CO_2-Gehalt und 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Medien und Lösungen wurden nach der Zubereitung sterilfiltriert oder autoklaviert und je nach Bedarf mit fötalem Kälberserum angereichert. Alle Arbeitsschritte bei denen Zellen gewonnen, genährt oder verdünnt wurden, wurden in einer Laminar Flow-Sterilbank ausgeführt. Alle Arbeitsgeräte, die bei der Zellkultur benötigt wurden, wurden vor jedem Gebrauch dampfsterilisiert. Zentrifugiert wurden die Zellen generell in verschließbaren Zentrifugenröhrchen in der Kühlzentrifuge 2KD von Sigma (800 rpm entsprechen 100 g). Zur Lagerung wurden Zellen bei einer Zelldichte von 5×10^6/ml in dem entsprechenden Medium, das mit 20 % fötalem Kälberserum und 10 % Glyzerin angereichert war, langsam eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Fusionslösung

Hierzu wurden 4,2 g Polyäthylenglykol 4000 (PEG, Serva) autoklaviert und in flüssigem Zustand unter sterilen Bedingungen mit serumfreiem Myelomamedium auf 10 ml aufgefüllt.

Medienzusammensetzungen:

	Myeloma-medium	HAT-Medium	HT-Medium
RPMI 1640-Pulver	5,2 g	5,2 g	5,2 g
PEN/STREP-Stammlsg.	5 ml	5 ml	5 ml
2-Mercaptoäthanol	2 µl	2 µl	2 µl
$NaHCO_3$	1 g	1 g	1 g
Hypoxanthin-Stammlsg.	-	5 ml	5 ml
Aminopterin-Stammlsg.	-	5 ml	-
Thymidin-Stammlsg.	-	5 ml	5 ml
H_2O bidest	435 ml	375 ml	380 ml
Fötales Kälberserum	50 ml	100 ml	100 ml
Gesamtvolumen	500 ml	500 ml	500 ml

PEN/STREP-Stammlösung:

2 g Penicillin G
4 g Streptomycin
in 500 ml H_2O bidest

HAT-Stammlösungen:

680 mg Hypoxanthin (H)
194 mg Thymidin (T)
9,55 mg Aminopterin (A)
in je 500 ml H_2O bidest

2.9.3. Zellfusion

Milzzellen

4 Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Maus getötet und die Milz herauspräpariert. Nachdem die Milz mit einer Schere in mehrere Stück zerteilt worden war, wurden die Milzzellen mit Hilfe einer Pinzette aus dem Gewebe herausgelöst, in 10 ml HT-Medium suspendiert und nach 10 Min. von den verbliebenen größeren Gewebebrocken abdekantiert. Anschließend wurden die Zellen 8 Min. bei 800 rpm abzentrifugiert und nachdem der

Überstand entfernt worden war, in 10 ml serumfreien Medium resuspendiert. (Gesamtzellzahl: 1,3 x 10^8)

Myelomazellen

Zur Fusion wurde die Myeloma-Zellinie P3-X63Ag8/653 verwendet (29). Die Stammkultur wurde in Zellkulturflaschen (Flaschenvolumen: 150 ml) gehalten und etwa 10 Tage vor der Fusion auf 6 große Zellkulturflaschen (Flaschenvolumen: 450 ml) ausgedehnt. Zur Fusion wurden die Zellen aus den Flaschen herausgespült, 8 Min. bei 800 rpm zentrifugiert und abschließend in 10 ml serumfreien Medium resuspendiert. (Gesamtzellzahl: 1,6 x 10^8)

Fusion (30)

Zur Fusion wurden die beiden Zellsuspensionen vereinigt, die Zellen durch eine niedertourige Zentrifugation (8 Min., 800 rpm) pelletiert und das Zentrifugenröhrchen anschließend mit dem gesamten Inhalt 30 Min. ins Eis gestellt. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Fusion der Zellen durch das langsame Zutropfen (1 ml Lösung in 45 Sek.) der 42 %-igen PEG 4000-Lösung begonnen. Das Zellpellet wurde während des Zutropfens durch Schütteln aufgelockert und anschließend die PEG-Konzentration durch die langsame Zugabe (Dauer: 7 - 8 Min.) von 10 ml HT-Medium verdünnt. Nach der weiteren Zugabe von 20 ml HT-Medium wurde versucht, verbliebene Zellklumpen durch vorsichtiges Schütteln zu resuspendieren. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (8 Min., 800 rpm), einmal mit Medium gewaschen und abschließend in 50 ml HAT-Medium aufgenommen. Nun wurde die Zellsuspension, die zum überwiegenden Teil aus nicht fusionierten Milz- oder Myelomazellen und nur zu einem sehr geringen Teil aus fusionierten Hybridomazellen besteht, auf die 480 Löcher von 20 Gewebekulturplatten gleichmäßig verteilt und jedes Loch mit 1 ml HAT-Medium aufgefüllt. Sieben Tage nach der

Fusion wurde das Zellkulturmedium zur Hälfte ersetzt und anschließend nach je drei bis vier Tagen zu je 75 %. Nach etwa drei Wochen wurden die Zellen auf HT-Medium umgestellt.

2.9.4. Reklonierung

Die Hybridomazellen eines Loches der Gewebekulturplatten deren Mediumüberstand eine positive Antwort bei den Tests auf spezifische Antikörperproduktion gegen Ecdysteron gegeben hatten, wurden subkloniert.

Hierzu wurden die Zellen in HT-Medium suspendiert und soweit verdünnt, daß pro 50 µl durchschnittlich eine Zelle vorhanden war. 5 ml dieser Verdünnung wurden nun gleichmäßig auf 96 Löcher einer Gewebekultur-Mikrotiterplatte verteilt. Ein bis zwei Tage vor der Subklonierung waren die Mikrotiterplattenlöcher bereits mit je 50 µl Medium mit je 5×10^5 Milzzellen von nicht immunisierten BALB/c-Mäusen versehen worden. Die Zellüberstände wurden nach sieben Tagen zum erstenmal zu 50 % ersetzt und in der nachfolgenden Zeit etwa alle fünf Tage zu maximal 75 %.
Wenn der Boden eines Mikrotiterplattenloches vollständig mit Hybridomazellen bedeckt war, wurden die Zellen wieder in große Gewebekulturplattenlöcher überführt und für die zweite Subklonierung herangezogen.

2.9.5. Aszites-Induktion in BALB/c-Mäusen

Die anti-Ecdysteron-Antikörper produzierenden Hybridomazellklone, die nach der zweiten Subklonierung als monoklonal angesehen werden können, wurden zunächst in großen Gewebekulturplatten angezogen. Etwa 10^6 Hybridomazellen, konzentriert in 0,5 ml HT-Medium, wurden dann in 10 - 12 Wochen alte BALB/c-Mäuse intraperitonal injiziert.

Zur Anregung des Immunsystems der Mäuse war ihnen etwa 2 - 3 Wochen vor der Aszites-Induktion je 0,5 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) ebenfalls intraperitonal eingespritzt worden.
In der Regel konnte diesen Mäusen 18 - 20 Tage nach der Zellinjektion unterschiedliche Mengen Aszitesflüssigkeit (5 - 15 ml) entnommen werden. Bei einigen Mäusen konnte diese Entnahme zweimal wiederholt werden.

Die Zellen in der Aszitesflüssigkeit wurden zunächst durch eine niedertourige Zentrifugation abgetrennt (8 Min., 800 rpm) und der Überstand anschließend durch eine hochtourige Zentrifugation geklärt (10 Min., 12000 g). Nach der letzten Zentrifugation wurden die Überstände mit Azid versetzt (Endkonzentration: 0,01 %) und bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.9.6. ELISA-Test

Da es nicht möglich war, die Vielzahl der Medienüberstände der heranwachsenden Zellklone alle mit der immunofluoreszenzmikroskopischen Methode auf ihren Gehalt an anti-Ecdysteron-Antikörper hin zu untersuchen, mußte dieser zeitaufwendigen Technik ein anderes Auswahlverfahren vorangestellt werden. Da ausreichende Mengen radioaktiv markierten Ecdysterons für Radioimmunotests (RIAs) nicht zur Verfügung standen, mußte das ELISA-Testverfahren (Enzym-linked immunosorbent assay) angewendet werden.

Dieser Test beruht darauf, daß das Antigen (hier Ecdysteron-Thyroglobulin-Konjugat; ebenfalls freundlicherweise von Herrn Prof. Spindler zur Verfügung gestellt) an einer Plastikoberfläche adsorbiert wird und die ecdysteronspezifischen Mausantikörper während der Inkubation mit den Medienüberständen der Zellklone bzw. mit der Aszitesflüssigkeit an dieses Ecdysteron-Konjugat binden. Diese Primärantikörper wiederum werden von Ziege-anti-Maus IgGs, an die alkalische Phosphatase kovalent

gebunden ist, während einer zweiten Inkubation mit der entsprechenden, antikörperhaltigen Lösung erkannt. Abschließend wird die alkalische Phosphatase durch eine Inkubation mit ihrem Substrat (para-Nitrophenylphosphat) nachgewiesen.

Aus der Vielzahl der verschiedenen Anleitungen (31) für diesen Test hat sich, für meine Zwecke, folgende Vorschrift als die Geeigneteste erwiesen:

- Übernachtinkubation von Mikrotiterplattenlöchern mit je 100 µl einer antigenhaltigen Lösung bei 4 °C (hier: 50 µg Ecdysteron-Thyroglobulin-Konjugat; 50 µg/ml PBS)
- Entfernen der antigenhaltigen Lösung und einmaliges Waschen der Löcher mit PBS/Azid
- 90-minütige Inkubation der Löcher mit je 380 µl einer 0,7 %-igen Ovalbumin/PBS-Lösung bei 37 °C
- zweimaliges Waschen der Löcher mit PBS/Azid
- vierstündige Inkubation der Mikrotiterplattenlöcher mit je 100 µl der auf Antikörper hin zu testenden Flüssigkeit bei 37 °C (1:10-, 1:20-, 1:50-, 1:100 -Verdünnungsreihe der Zellkulturüberstände entweder der Primärklone oder der aufgrund der ersten und der zweiten Subklonierung isolierten Zellklone; 1:10-, 1:100-, 1:500-, 1:1000 -Verdünnungsreihe der Aszitesflüssigkeit)
- dreimaliges Waschen der Löcher mit PBS/Azid
- neunzigminütige Inkubation mit, mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Maus-IgGs (100 µl einer 1:500- oder einer 1:1000 -fachen Verdünnung der handelsüblichen Präparate)
- achtmaliges Waschen mit PBS/Azid
- sechzig- bis neunzigminütige Inkubation mit 75 µl einer pNpp/Pufferlösung bei 37 °C (5 mM para-Nitrophenylphosphat (pNpp) in 1 M Diethanolamin, 2 mM MgCl, pH 9,8)

Zur Spezifitätskontrolle wurde als Antigen nicht modifiziertes Thyroglobolin eingesetzt; um das Testverfahren als solches zu kontrollieren, wurde entweder die Inkubation der Mikrotiterplattenlöcher mit Thyroglobolin bzw. Ecdysteron-Thyroglobolin-Konjugat oder mit dem Primärantkörper weggelassen. In allen Fällen mußten die so behandelten Löcher farblos bleiben. Anti-Ecdysteron-Antikörper produzierende Zellklone wurden durch die bereits kurz nach Beginn der letzten Inkubation auftretende Gelbfärbung der entsprechenden Mikrotiterplattenlöcher identifiziert. Nur diese antikörperhaltigen Flüssigkeiten wurden anschließend mit Hilfe der immunofluoreszenzmikroskopischen Technik weiter untersucht.

3. RESULTATE

3.1. Lichtinduzierte Umwandlung von Ecdysteron

Die chromatographische Analyse einer bestrahlten Ecdysteronlösung (10^{-3}M, in Äthanol) zeigt, daß innerhalb sehr kurzer Zeit eine quantitative Umwandlung des Steroidmoleküls in ein neues, nicht identifiziertes Produkt einsetzt (Abb. 1). Auch die Anwesenheit einer großen Proteinmenge während der Belichtung (10^{-3}M Ecdysteron, 1 % BSA in Wasser) beeinflußt diesen Prozeß nicht merklich.

Die Geschwindigkeit der Umwandlung und der, nach ausreichend langer Einstrahlung, vollständigen Zerstrahlung des Ecdysterons ist abhängig von dem Anteil des kurzwelligen Lichtes, der vom jeweils verwendeten Kantenfilter nicht ausgeblendet wird und dem Material der Belichtungsküvette. Bei der Benutzung des Kantenfilters WG320 und einer Belichtungsküvette aus normalem Glas, ist bei den in den Abschn. 2.4. und 2.4.1. beschriebenen Bestrahlungsbedingungen diese Umwandlung nach 10 - 12 Min. komplett abgeschlossen.

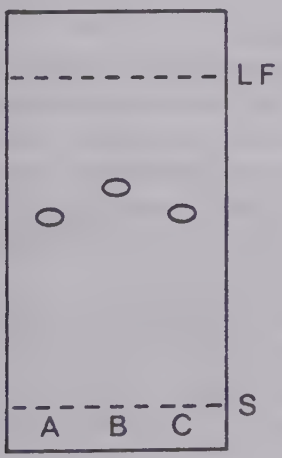

Abb. 1:
Dünnschichtchromatographische Analyse des durch die Belichtung erzeugten Umwandlungsproduktes des Ecdysterons (Belichtungszeit: 12 Min.)
A: Ecdysteron, R_f-Wert 0,58
B: Umwandlungsprodukt, R_f-Wert 0,67
S: Auftragslinie; LF: Laufmittelfront
Laufmittel: Aceton/Dichlormethan/Wasser: 62,5/15/10; Dünnschichtplatte: Polygram SIL G/UV_{254}-Fertigfolien

3.1.1. Radioimmunologischer Vergleich zwischen belichtetem und unbelichtetem ^{3}H-Ecdysteron

Um festzustellen, ob das durch die Belichtung erzeugte Umwandlungsprodukt des Ecdysterons von dem für die immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendeten anti-Ecdysteron-Kaninchenserum erkannt wird, wurden vergleichende RIA-Tests durchgeführt. Hierzu wurden parallel gleiche Mengen ^{3}H-Ecdysteron und belichtetes ^{3}H-Ecdysteron (Belichtungszeit 12 Min.) mit einer Verdünnungsreihe des anti-Ecdysteronserums 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das an Antikörpern nicht gebundene, freie Steroid wurde anschließend durch Adsorption an Aktivkohle/Dextran entfernt und die verbliebene Radioaktivitätsmenge in den Überständen bestimmt.

Die Auftragung der Meßwerte zeigt (Abb. 2), daß durch die Belichtung die für die Antikörpererkennung wichtigen Determinanten des Steroids offensichtlich nur wenig verändert werden. Bei allen Serumverdünnungen lagen die Werte für das belichtete Ecdysteron, verglichen mit denen für unbelichtetes Ecdysteron, um lediglich 10 - 15 % niedriger.

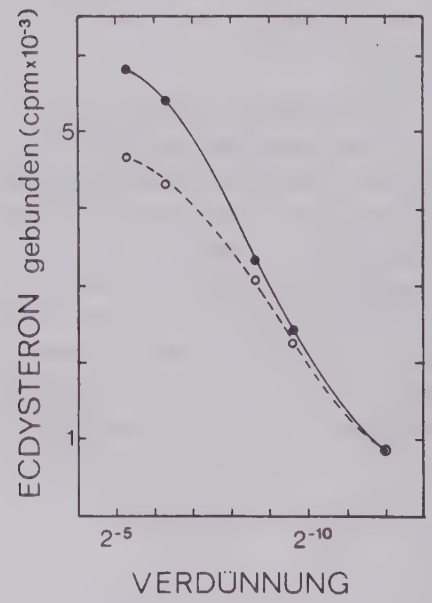

Abb. 2:
Wiedergabe der Bindungskurven des für die Immunofluoreszenzanalysen verwendeten anti-Ecdysteronserums mit unbelichtetem (ausgefüllte Kreise) und belichtetem ^{3}H-Ecdysteron (offene Kreise). Gesamtradioaktivität pro Ansatz: 8300 cpm; Details siehe Abschn. 2.7. und 3.1.1.

3.2. Belichtungszeitoptimierung für Speicheldrüsen

Da bekannt ist, daß biologisches Material durch intensive Lichteinwirkung irreversibel geschädigt werden kann (34, 35) und die für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis notwendige Quervernetzung von Ecdysteron mit dem ecdysteronspezifischen Protein sehr schnell vonstatten gehen sollte, wurde versucht, die anfänglich sehr lange Belichtungszeit der Speicheldrüsen (30 Min.) herabzusetzen. Hierzu wurden Speicheldrüsen des gleichen Entwicklungszustandes, unter sonst identischen Bedingungen, unterschiedlich lange belichtet und anschließend immunofluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Da eine Absolutmessung der Fluoreszenzintensitäten nicht möglich war, wurden die Präparate direkt miteinander verglichen. Die subjektive Beurteilung dieser Testreihe ergab, daß die Fluoreszenzintensitäten der für Ecdysteron spezifischen Chromosomenorte bis zu einer Bestrahlungszeit von etwa 5 Min. (Kantenfilter WG320) zunahm und dann bis zu einer Bestrahlungszeit von 20 Min. konstant blieb. Bei noch längerer Bestrahlungszeit konnte wieder eine Abschwächung der Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden.
Daher wurden bei sämtlichen folgenden Untersuchungen die Speicheldrüsen nur noch 5 Min. bestrahlt.

3.3. Vergleich der Herstellung von Quetschpräparaten

Um aussagekräftige Untersuchungen der Chromosomen zu ermöglichen, müssen die Präparate vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse so fixiert werden, daß die Struktur der Chromosomen und die Verteilung der Proteine auf ihnen durch die Fixierung und Präparation nicht verändert wird. Hierzu sind verschiedene Fixiermethoden entwickelt worden, die jedoch alle einen Kompromiß zwischen gegenläufigen Forderungen darstellen (36).

- Es sollten möglichst alle Proteine, die in vivo an die DNA gebunden sind an dieser Position fixiert werden.
- Die Denaturierung sowohl der DNA- als auch der Proteinstrukturen sollte möglichst gering sein.
- Eine, durch die Fixierung begründete, unspezifische Wechselwirkung zwischen den Präparatstrukturen und den verwendeten Antikörpern sollte minimal sein.
- Die Chromosomenarme sollten nach dem Quetschen der Präparate unverletzt sein und möglichst freiliegen.
- Nach dem Anfärben der Präparate muß eine Bestimmung der jeweiligen Chromosomenorte anhand einer Chromosomenkarte möglich sein.

Um die, für meine Untersuchungen, geeigneteste Methode herauszufinden, wurden zwei gebräuchliche Fixiermethoden direkt miteinander verglichen:

A) Einminütige Inkubation in 1 % Triton X-100/PBS gefolgt von der Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd in 45 % Essigsäure/ Wasser für eine Minute.
B) Einminütige Fixierung in 75 % Äthanol/25 % Essigsäure gefolgt von einer fünfminütigen Fixierung in 45 % Essigsäure, 10mM $MgCl_2$.

Hierzu wurden Speicheldrüsen nach der Belichtung halbiert und die Hälften nach der Methode A bzw. B fixiert. Die anschließende Inkubation mit Antikörpern erfolgte bei beiden Methoden völlig identisch.

In Abb. 3 sind die Ergebnisse beider Fixiermethoden anhand des linken Arms von Chromosom 2 einander gegenübergestellt. Man erkennt, daß die Fluoreszenzen auf den Chromosomen, die nach Methode B fixiert sind, schwächer sind und eine schlechtere Feinstruktur besitzen. Auch die Phasenkontrastaufnahmen besitzen nicht die Auflösung, die bei Chromosomen, die nach Methode A fixiert werden, erreicht werden können.

Aus diesen Gründen wurden die Speicheldrüsen aller in vitro Experimente mit Hilfe der Methode A fixiert.

Fixiermethode A Fixiermethode B

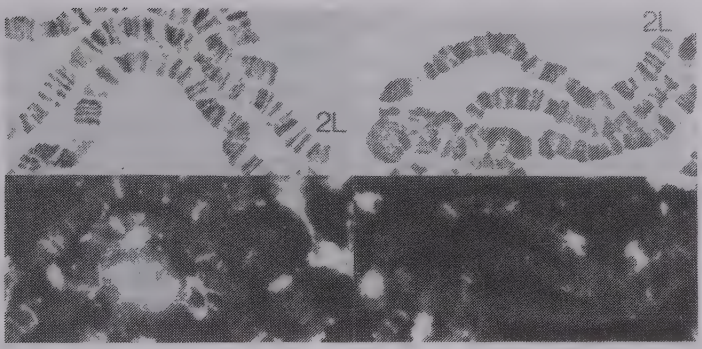

Abb. 3:
Direkter Vergleich von zwei unterschiedlichen Fixiermethoden. Abgebildet ist jeweils der linke Arm von Chromosom 2. Details siehe Abschn. 2.5. und 3.3.; Vergrößerung: 950x.

3.4. Indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie

3.4.1. Spezifitätskriterien

Wenn mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenzmikroskopie Aussagen darüber gemacht werden, welche chromosomalen Loci von D. melanogaster unter der direkten Kontrolle des Ecdysterons stehen, ist die Verlässlichkeit dieser Aussagen in hohem Maße abhängig von der Spezifität des verwendeten anti-Ecdysteron-serums. Daher mußte gezeigt werden, daß die Antikörper des

Serums auf den fixierten Chromosomen nur Ecdysteronmoleküle bzw. deren Determinanten erkennen und nicht unspezifisch mit DNA-bindenden Proteinen oder dekondensiertem Chromatin wechelwirken (37).

Unter Anwendung der indirekten Immunofluoreszenztechnik läßt sich diese Spezifität unter anderem durch negative Kontrollen, d. h. durch das Fehlen von Fluoreszenzen auf Strukturen, die mit fluoreszenztragenden vergleichbar sind, zeigen. Hierzu wurden einige Experimente, die bereits von Dr. H. Gronemeyer durchgeführt und beschrieben wurden (20, 27), wiederholt. Die Resultate demonstrieren die hohe Spezifität mit der das verwendete Serum nur ecdysteroneigene Determinanten auf den fixierten Chromosomen erkennt.

- Der Nachweis von Ecdysteron auf den Chromosomen ist abhängig von der photochemischen Quervernetzung des Steroids mit dem ecdysteronspezifischen Protein. Werden Quetschpräparate unbelichteter Speicheldrüsen immunofluoreszenzmikroskopisch analysiert, läßt sich keine spezifische Fluoreszenz nachweisen (27).
- Wird das anti-Ecdysteron-Kaninchenserum bei der Inkubation der Quetschpräparate belichteter Speicheldrüsen durch ein Kaninchennormalserum ersetzt, läßt sich, je nach Spendertier, entweder keine Fluoreszenz zeigen oder die gesamte Chromosomenstruktur und die Cytoplasmareste werden unterschiedslos angefärbt (27).
- Durch einen Hitzeschock (37 ^{o}C) werden auf den Chromosomen innerhalb sehr kurzer Zeit neun große Hitzeschockpuffs induziert und gleichzeitig beginnen andere, zur Zeit des Hitzeschocks aktive, ecdysteronsensitive Puffs zu kondensieren. Abb. 4 zeigt die immunofluoreszenzmikroskopische Analyse eines Quetschpräparates von Speicheldrüsen, die vor der Belichtung 30 Min. bei 37 ^{o}C in Gegenwart von 5 x 10^{-6}M Ecdysteron in Grace's Medium inkubiert worden sind (38).

Trotz der Anwesenheit großer Puffs ist auf dem gesamten Präparat keine spezifische Fluoreszenz sichtbar.

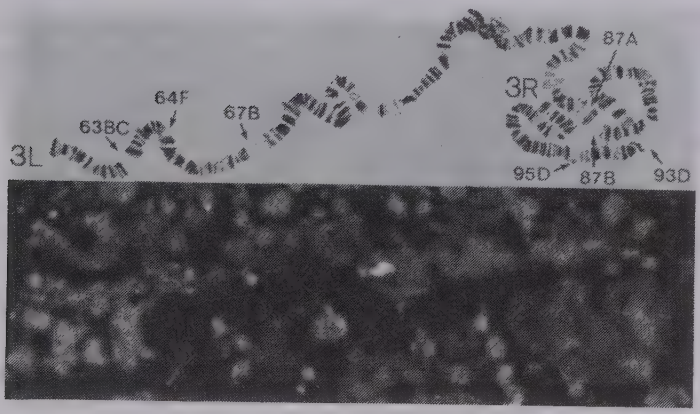

Abb. 4:
Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse des Chromosoms 3 nach Hitzeschock (30 Min., 37 °C).
Alle Hitzeschockpuffs, die für dieses Chromosom bekannt sind (38), sind induziert. Die vor dem Hitzeschock aktiven Puffs (z. B. bei 74EF und 75B) sind noch nicht komplett zurückgebildet. Vergrößerung: 600x

Die Aussage des Hitzeschockexperimentes, daß die Antikörper des verwendeten Serums nicht generell an dekondensiertes Chromatin (Puffs) binden, wird auch durch die Feststellung unterstützt, daß auf allen Chromosomenpräparaten, die für die Untersuchung der zeitlichen Kontrolle der Ecdysteronbindung an polytänen Chromosomen angefertigt wurden, große, dekondensierte Strukturen sichtbar sind, die keine Fluoreszenz tragen. Häufig liegen sie in direkter Nachbarschaft zu stark leuchtenden, chromosomalen Loci (Abb. 5).

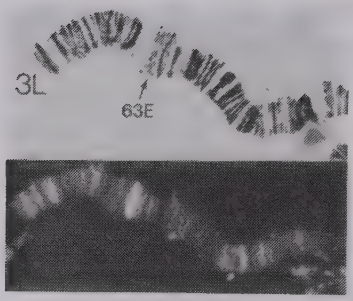

Abb. 5:
Analyse der Spitze des linken Arms von Chromosom 3. Die Fluoreszenz ist in einer schmalen Bande bei 63E konzentriert, obwohl der gesamte Chromatinbereich bei 63 dekondensiert ist. Vergrößerung: 980x

Ein weiterer Beweis für die Spezifität des verwendeten anti-Ecdysteron-Kaninchenserums ist der immunofluoreszenzmikroskopische Vergleich dieses Serums mit anderen, ebenfalls gegen Ecdysteron erzeugten Seren. Ein von Dr. J. Koolmann zur Verfügung gestelltes und von ihm ausführlich charakterisiertes anti-Ecdysteron-Kaninchenserum (28) zeigt beim Vergleich mit dem von Dr. H. Gronemeyer erstellten Serum auf den Chromosomenpräparaten ein identisches Fluoreszenzverteilungsmuster, wenn Speicheldrüsen desselben Puffstadiums benutzt werden (Abb.6

Ein Nachteil aller polyklonaler Seren gegen Ecdysteron ist jedoch der Umstand, daß sie bezüglich der Antikörperkonzentrationen und der Kreuzreaktion mit ähnlichen Steroidhormonen (z. B. Ecdyson) stark variieren und sich daher Meßwerte, die mit verschiedenen Seren bestimmt worden sind, nicht direkt miteinander vergleichen lassen (39).
Neue immunologische Techniken mit denen monoklonale Antikörper zugänglich sind, machen jedoch die Erzeugung von hochspezifischen, standardisierten Seren möglich. Daher wurde versucht mit dieser Technik monoklonale Antikörper gegen Ecdysteron zu erzeugen.

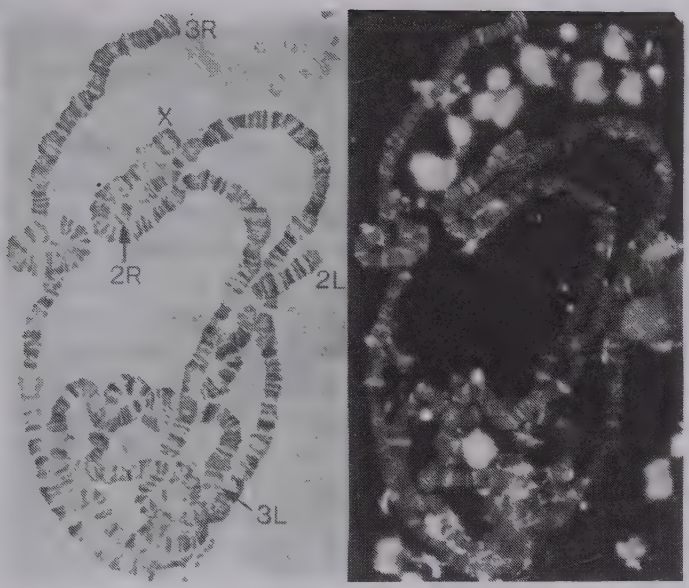

Abb. 6:
Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse von Speicheldrüsenchromosomen des Puffstadiums 3/4 nach spezifischer Markierung mit einem anti-Ecdysteronserum (Das Serum wurde hergestellt von Dr. J. Koolmann(28)); Vergrößerung: 650x.

3.5. Monoklonale Antikörper

Zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen Ecdysteron wurden zunächst Mäuse mit einem Ecdysteron-Hämocyanin-Konjugat immunisiert und, nachdem in dem Blut der Mäuse eine ecdysteronspezifische Antikörperpopulation nachgewiesen werden konnte, einem Tier die Milz entnommen. Anschließend wurden die Milzzellen mit Hilfe von Polyäthylenglykol mit Zellen der Myeloma-

linie P3-X63Ag8/653 fusioniert. Aus dieser Fusion resultieren Hybridomazellen, die unter Zellkulturbedingungen wachsen können und Antikörper in das Zellkulturmedium abgeben.

Die Zellen waren nach der Fusion in HAT-Medium suspendiert und dann gleichmäßig auf 480 Löcher von Gewebekulturplatten verteilt worden. Das HAT-Medium ist ein Selektionsmedium, in dem nur die in der Fusion gewonnenen Hybridomazellen wachsen können, nicht aber die nicht fusionierten Milz- und Myelomazellen. Daher starben diese etwa 10 Tage nach der Fusion ab. Gleichzeitig wurden die ersten Hybridomazellklone sichtbar, jedoch auch eine weitere, völlig anders strukturierte, fibroblastenähnliche Zelle, die offensichtlich aus dem Bindegewebe der verwendeten Milz stammte. Diese war in nahezu allen Kulturplattenlöchern sichtbar und zeigte ein schnelleres Wachstum als die Hybridomazellen. Da die fibroblastenähnlichen Zellen im Gegensatz zu den Hybridomazellen jedoch sehr stark an der Plastikoberfläche hafteten, konnten die wachsenden Hybridomazellklone aus den kontaminierten Zellkulturlöchern vorsichtig herausgespült und in neue Gewebekulturplattenlöcher umgesetzt werden. Durch mehrmaliges Umsetzen war es möglich, diese Zellkontamination zu beseitigen. Zum Schluß blieben 56 Klone übrig, deren Zellkulturüberstände mit Hilfe des ELISA-Tests auf spezifische Antikörper gegen Ecdysteron hin getestet wurden.

Mit dem ELISA-Test werden nur die Bindungseigenschaften der Antikörper an ein Ecdysteron-Protein-Konjugat bestimmt und daher sind Aussagen über die Bindung an das freie Steroid nicht möglich. Da die Antikörper jedoch in erster Linie bei der immunofluoreszenzmikroskopischen Analyse eingesetzt werden sollten und hier das Ecdysteron ebenfalls an ein Protein gebunden ist, wurde diese Einschränkung der Testaussage in Kauf genommen.

Sechs der getesteten Klone zeigten im ELISA-Test eine deutlich positive Reaktion und deren Medienüberstände wurden anschließend immunofluoreszenzmikroskopisch weiter untersucht. Bei allen Zellüberständen ergab sich eine, verglichen mit Überständen von Zellklonen, die bei ELISA-Test negativ reagierten, spezifische, jedoch sehr intensitätsschwache Fluoreszenz. Der Zellklon der die höchste Fluoreszenzintensität zeigte, wurde zweimal subkloniert und dann für die Aszitesinduktion in BALB/c-Mäusen verwendet. Auch die Aszitesflüssigkeit, die verglichen mit Zellkulturüberständen, einen deutlich höheren Antikörpertiter aufweist (40), erbrachte keine größere Intensität der spezifischen Fluoreszenzen. Eine Dekomplementierung (30-minütiges Erhitzen auf 57 ^{o}C) bzw. Verdünnung der Aszitesflüssigkeit änderte dieses Ergebnis nicht.

Da die vorhandene Kameraeinrichtung des Mikroskops aufgrund der langen Lichtwege nur bei lichtstarken Objekten zufriedenstellende Fotographien ermöglicht, konnte dieser Antikörper für die immunofluoreszenzmikroskopischen Analysen nicht verwendet werden und wurde daher auch nicht weiter charakterisiert.

3.6. Immunofluoreszenzmikroskopische Analysen der Ecdysteronbindung an Speicheldrüsenchromosomen von D. melanogaster

3.6.1. Chromosomale Bindungsmuster von Ecdysteron in den verschiedenen Entwicklungsstadien

Um zu dokumentieren in welcher zeitlichen Abfolge das Ecdysteron an die verschiedenen Genorte auf den polytänen Chromosomen von D. melanogaster bindet, wurden Speicheldrüsenchromosomen des jeweiligen Entwicklungszustandes immunofluoreszenzmikroskopisch analysiert. Eine zusammenfassende Darstellung der Technik, die eine Bestimmung dieser Genorte erlaubt, ist in Abb. 7 gezeigt.

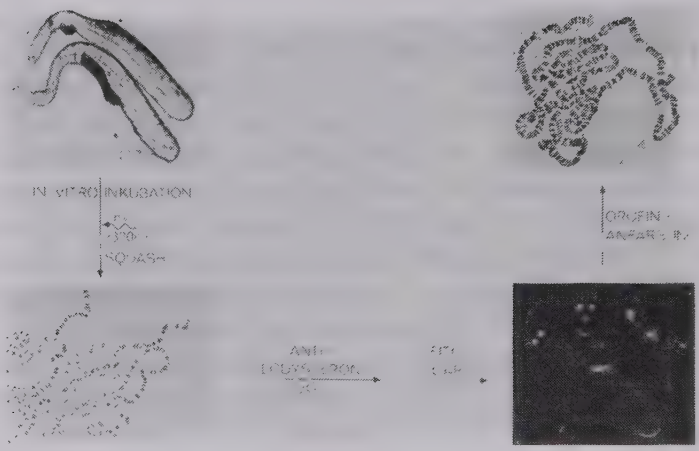

Abb. 7:
Schematische Darstellung der Technik zum Nachweis der ecdysteronbindenden Loci auf Speicheldrüsenchromosomen. hν: Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge oberhalb von 320 nm.

Um Speicheldrüsen des jeweils gewünschten Entwicklungszustandes zu erhalten, wurde die von Ashburner beschriebene Technik der *in vitro* Inkubation von Speicheldrüsen des Puffstadiums 1 in Gegenwart von 5×10^{-6} M Ecdysteron in Grace's Medium verwendet (15). Hierdurch ließ sich die *in vivo* Entwicklung der Speicheldrüsen bis zum Puffstadium 10 präzise nachvollziehen.

Durch die unterschiedlich langen Inkubationen bei Raumtemperatur wurden reproduzierbar folgende Puffstadien (ausgehend vom Puffstadium 1) erreicht:

0 h Inkubation Puffstadium 1
1 h Inkubation Puffstadium 2/3
2 h Inkubation Puffstadium 4/5
4 h Inkubation Puffstadium 7/8
6 h Inkubation Puffstadium 9/10 (Beginn des Vorpuppenstadiums)

Eine mehr als sechsstündige Inkubation erwies sich als nicht sinnvoll, da sich nach dieser Inkubationsdauer die einzelnen Zellen der Speicheldrüsen nicht mehr synchron entwickelten.

In Abb. 8 - 12 sind die immunofluoreszenzmikroskopischen Analysen und die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen der Speicheldrüsenchromosomen in den verschiedenen Entwicklungsstadien, beginnend mit Puffstadium 1 (Abb. 8) bis zum Eintritt in das Vorpuppenstadium (Abb. 12) gezeigt. In Tab. 1 sind die chromosomalen Loci, an die während der Entwicklung von PS1 bis PS10 das Ecdysteron zeitweise gebunden ist und die in Abb. 8 - 12 durch Pfeile nur exemplarisch markiert sind, aufgelistet. Hierbei sind nur die Genorte aufgeführt, deren Fluoreszenzmarkierung auf allen Präparaten aus mindestens fünf unabhängigen Präparationen deutlich über der Fluoreszenz des Hintergrundes bzw. der Cytoplasmareste lag.

Abb. 8: Analyse des Quetschpräparates einer Speicheldrüse des Puffstadiums 1 (0 h Inkubation) Vergrößerung: 1000x.
Abb. 9: Analyse des Quetschpräparates einer Speicheldrüse des Puffstadiums 2/3 (1 h Inkubation) Vergrößerung: 900x.
Abb. 10: Analyse des Quetschpräparates einer Speicheldrüse des Puffstadiums 4/5 (2 h Inkubation) Vergrößerung: 800x.
Abb. 11: Analyse des Quetschpräparates einer Speicheldrüse des Puffstadiums 7/8 (4 h Inkubation) Vergrößerung: 830/1000x.
Abb. 12: Analyse des Quetschpräparates einer Speicheldrüse des Puffstadiums 9/10 (6 h Inkubation) Vergrößerung: 800x.
Alle Abbildungen auf den folgenden Seiten.

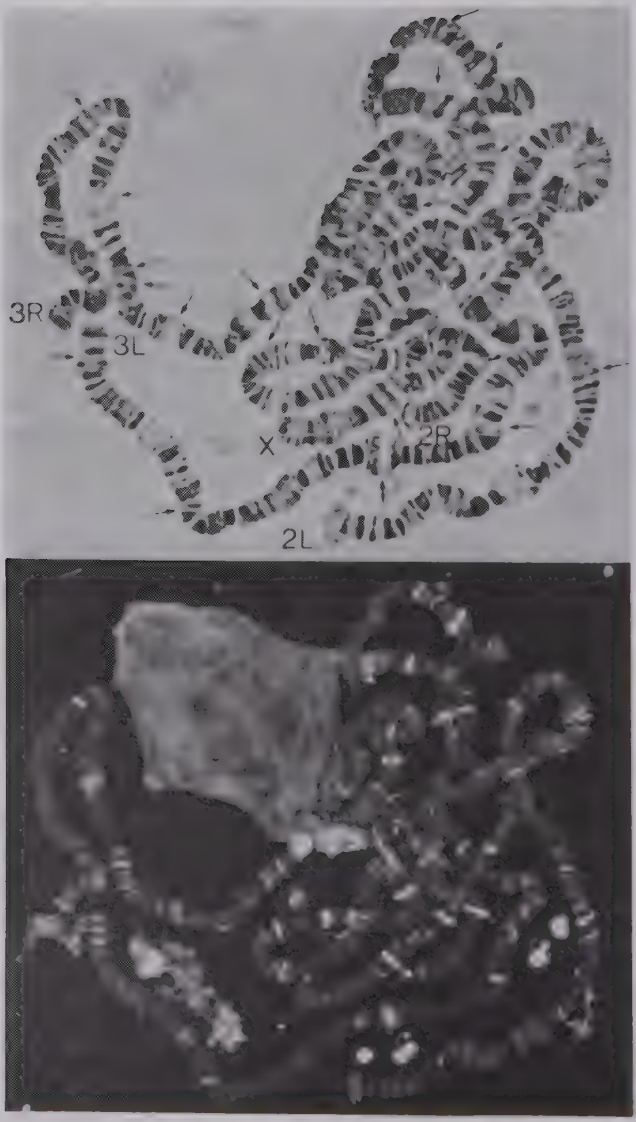

Abb. 8

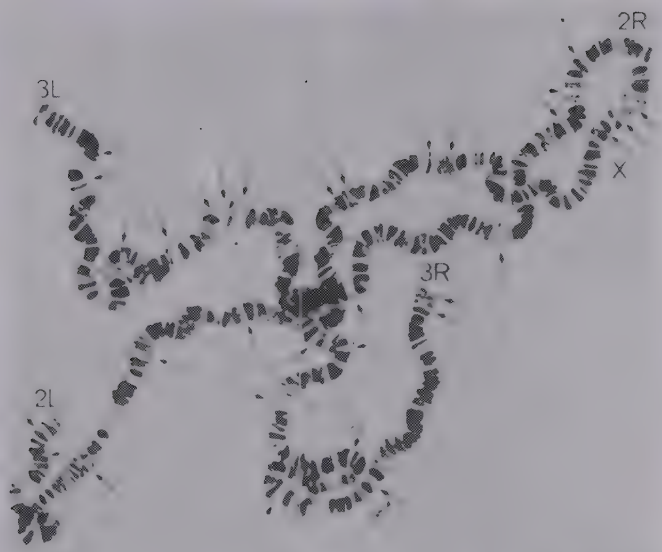

Abb. 9

Abb. 10

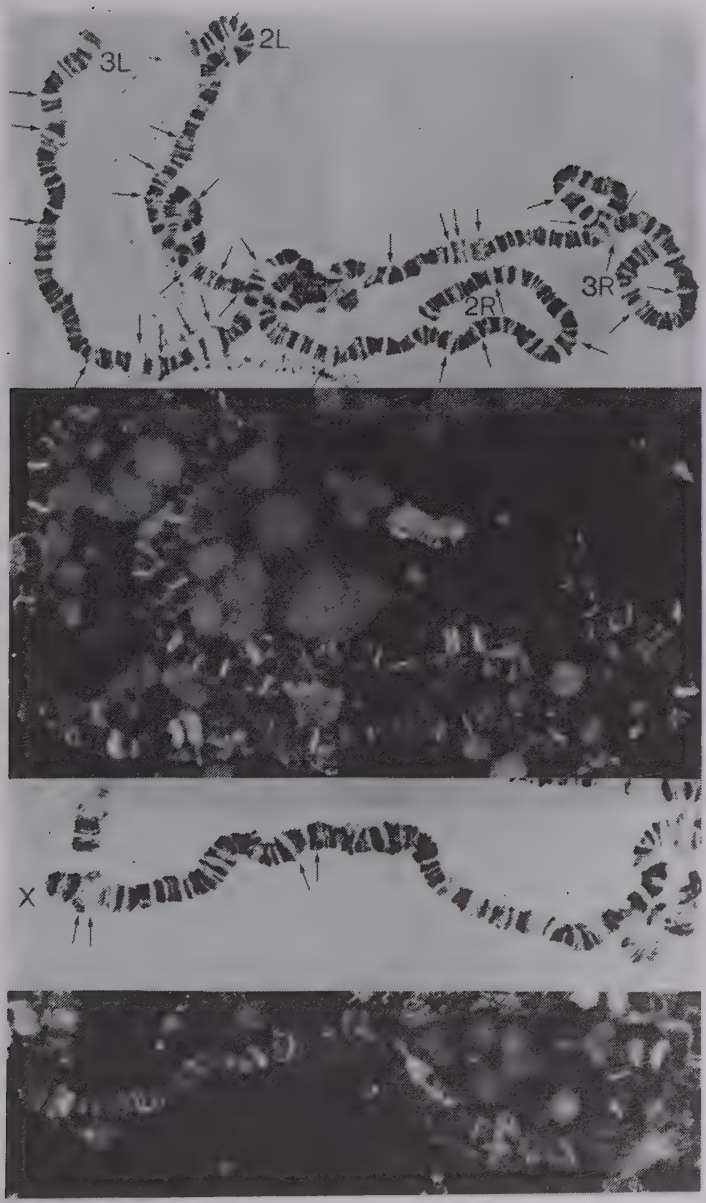

Abb. 11

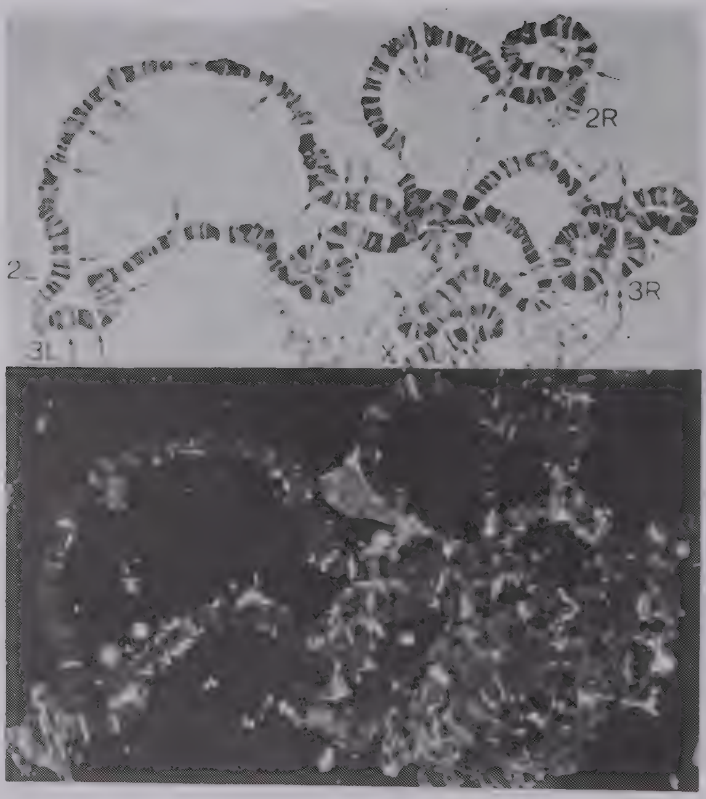

Abb. 12

Tab. 1a:

X-Chromosom

PS	1C	2B5-6	2B13-17	3A	3C	3E	8D	9A	9EF	11B	12A	15C	16A	16C
1		o		+	+o	o	+o			o		o		
2/3		+o	+o	+	+o	+o				+o	+	+o	+o	
4/5		+o	+o							o		o	+	
7/8	+o	+o	+o	o			+o	+	o	o		o		
9/10	o	+o	+o	+o		+o	o		+o	o		o		+o

Tab. 1b:

Linker Arm von Chromosom 2

PS	21C	22B4-5	22C	26B	27C	28D	29A	30A	33E	34A	36F	37C	38B
1	o					+				o	+	+	+
2/3	+o	+o			+			+	+	+o	+	+	+
4/5		+o			+			+		+o	+	+	+
7/8			+o		+		+	+	o	+o	+	+	+
9/10			+o	+o	+		+	+	o	+	+	+	+

Tab. 1c:

Rechter Arm von Chromosom 2

PS	42A	43E	46A	46F	47A	47BC	48B	50F	50CD	52A	52C	53CD	55E	56DE	57E	57F	58DE
1	+o	+o			+	+					+o	+		+			+o
2/3	+o	o			o	o		+	+o					+	+		+o
4/5	+o	o	+	o	o	o		+	+o				o		+o	+	+o
7/8	o	o	+o	o	o	o	+o		+o	+			+o		o		+o
9/10		o	+o	+o	+o	o	o	+	+o	+		+	o				o

Tab. 1a - 1e: (auf dieser und der folgenden Seite)
Korrelation von den Puffmustern und den Fluoreszenzmarkierungen für die Chromosomen von D. melanogaster.
+: signifikante Fluoreszenzmarkierung; o: Puffausbildung, entnommen aus (11)

Tab. 1d:

Linker Arm von Chromosom 3

PS	61C	61F	62E	62F	63E	63F	64C	66B	68C	69A	70C	70E	71DE	72D	74C	74EF	75B	76D	78D
1	+						+		+o	+o		+						+	
2/3			+	+		+o			+	+			+o	o	+o	+o	+o		
4/5			+o			+o		+			o		+o	o		+o			
7/8			+o		+o	o		+			+o	+	+o	+o		+o	+o		+o
9/10		+	+o	o	+o			+o			+o	+o	+o	+o		+			+o

Tab. 1e:

Rechter Arm von Chromosom 3

PS	82F	83E	84F	85D	85D	85F1-6	86E	86F	88A	88D	88EF	89B	89D	90BC	91B	92A	92D	93D	93F	94EF	95B	95F	96E	98E	99B	100C	100D
1			+				o			+			+	+o		+	+	+				+			o	+	+
2/3		+o		+		+o	+	+	+	o	+o	o		+o	+			o		+			o		+o	+	+
4/5		+o		+	+	+o	+	+	+	+o	+o	o		o				+o					o		+o		
7/8	+	+o		+	+	+o				+o		+o						+o	+		o	o	+	+	o		
9/10	+o	+o	o			o	+			+o			o		o			+o			+o	+o			o		

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Experimentreihe können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Zu einem Zeitpunkt, zu dem der Ecdysterontiter noch niedrig ist (frühes drittes Larvenstadium, PS1) (39) stehen einige Gene unter direkter Kontrolle des Steroids (z. B. bei 68C und 3C; Abb. 8). Andere, zu diesem Zeitpunkt ebenfalls aktive Gene binden dagegen weder während dieser Phase noch während der Regression, die sofort nach dem Anstieg der Ecdysteronkonzentration einsetzt, das Steroid (z. B. bei 25B; Abb. 8, 9).
- Zwischen dem von Ashburner beschriebenen Aktivitätsmuster früher Gene (PS1 bis PS7) (11) und deren Ecdysteronbindung, nachgewiesen durch die Fluoreszenzmarkierung, besteht eine gute Korrelation (Tab. 1). Viele dieser frühen Gene zeigen während der Aktivierung durch das Ecdysteron auch eine Steroidbindung (z. B. bei 5OCD, 63E, 63F, 74EF, 75B; Abb.9-11). Zusätzlich zu diesen bereits als ecdysteronsensibel bekannten chromosomalen Loci werden jedoch während der gesamten beobachteten Entwicklungsphase (PS1 bis PS10) einige Genorte (z. B. bei 38B, 86F, 88 A, Abb. 9, 10) offensichtlich ebenfalls durch eine Steroidbindung aktiviert, da auch sie eine starke Fluoreszenzmarkierung tragen. Ebenso existieren Loci für die keine Ecdysteronbindung nachgewiesen werden konnte, obwohl sie auf den Anstieg der Ecdysteronkonzentration sofort mit einer Puffausbildung reagieren (z. B. bei 23B; Abb. 9, 10).
- Auch einige der "späten" Gene, deren Aktivierung von einer vorausgehenden Proteinbiosynthese abhängt (17, 19) (z. B. bei 22C, 78D) stehen offensichtlich unter direkter Kontrolle des Steroids, da während der Aktivitätsphase dieser Gene eine Ecdysteronbindung an die dekondensierten Loci nachweisbar ist.
- Nach der Regression von Puffs läßt sich an diesen kondensierten Chromatinstrukturen keine Fluoreszenz und damit keine Ecdysteronbindung mehr nachweisen (z. B. bei 68C; Abb. 13A).

- In großen, ecdysteronabhängig aktivierten Puffs ist die Fluoreszenzverteilung häufig nicht homogen, sondern konzentriert sich in schmalen Bereichen des Gesamtpuffs (z. B. bei 63E; Abb. 5; bei 71 E, 74EF; Abb. 13B).

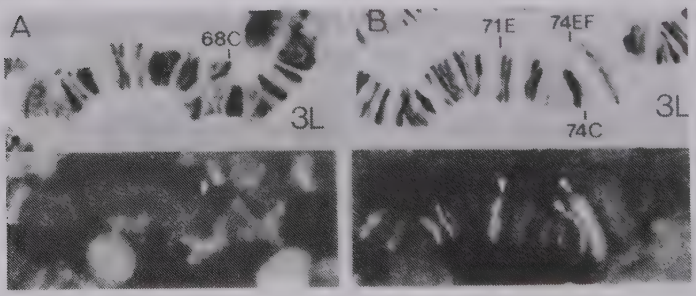

Abb. 13:
Ausschnittvergrößerungen des linken Arms des Chromosoms 3 nach zweistündiger Inkubation einer Drüse des Puffstadiums 1 in Grace's Medium, 5 x 10^{-6} M Ecdysteron.
A) Der Intermoltpuff bei 68C ist kondensiert und es läßt sich keine Ecdysteronbindung mehr nachweisen.
B) In großen Puffs ist das Ecdysteron häufig in schmalen Bereichen der Gesamtstruktur konzentriert.
Vergrößerung beider Ausschnitte: 1460x.

Um sicher zu sein, daß die in vitro Inkubation der Speicheldrüsen die Resultate nicht durch eine Artefaktbildung verfälschen, wurden die so erzielten Puff- und Fluoreszenzmuster exemplarisch verglichen mit Immunofluoreszenzanalysen von Speicheldrüsenchromosomen, die sich in der Larve etwa bis zum Puffstadium 8 entwickelt hatten.

Da in diesem Stadium das Drüsenlumen mit den Glueproteinen ausgefüllt ist und diese Proteine durch eine Formaldehydfixierung zu einer kompakten Masse quervernetzt werden, mußten diese Drüsen mit der in Abschn. 3.3. diskutierten Fixiermethode A präpariert werden.

Durch diese Experimente konnte die Feststellung von Ashburner (15) bestätigt werden, daß die in vivo Entwicklung des Puffmusters auf Chromosomen sehr genau durch die in vitro Inkubation von Speicheldrüsen des Puffstadiums 1 in der Gegenwart von 5×10^{-6} M Ecdysteron nachvollzogen werden kann. Auch die Fluoreszenzmarkierungen dieser Präparate entsprachen den oben dargestellten Ergebnissen der in vitro Inkubationen.

Als Beispiel ist hierfür in Abb. 14 der linke Arm des Chromosoms 3 gezeigt (vergleiche hierzu Abb. 10, 11).

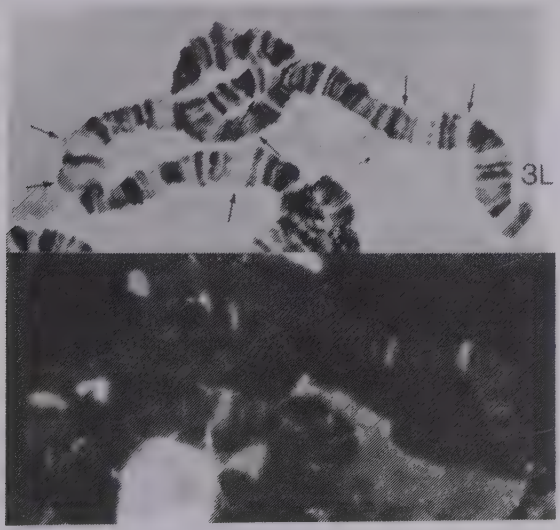

Abb. 14: Analyse des linken Arms des Chromosoms 3, das sich in vivo bis zum Puffstadium 8 entwickelt hat. Vergrößerung: 1100x

3.6.2. Einfluß von Actinomycin D auf die Entwicklung von Speicheldrüsen

Durch die Inkubation von Speicheldrüsen in Gegenwart von Ecdysteron (5×10^{-6} M) und Actinomycin D (2,57 µg/ml; 10 µg/ml wurde der Einfluß von RNA-Biosyntheseinhibitoren auf die Entwicklung der Speicheldrüse untersucht.

Durch diese Experimente wurden die Ergebnisse Ashburners bestätigt, daß die an eine Chromatinkondensation bzw. -dekondensation gebundene Entwicklung der Speicheldrüsenchromosomen nur möglich ist, wenn eine RNA-Neusynthese stattfinden kann (24). Durch die Einwirkung von Actinomycin D wird die kontinuierliche Entwicklung unterbrochen und die jeweils erreichte Entwicklungsstufe (z. B. PS1 oder PS5) "eingefroren".

In der Abb. 15 ist dies für mehrere Chromosomen im Puffstadium gezeigt. Trotz zweistündiger Einwirkung von Ecdysteron in Gegenwart von Actinomycin D (2,57 µg/ml) hat sich das Puff- und Fluoreszenzmuster gegenüber dem Muster vor Beginn der Inkubation (vergleiche hierzu Abb. 8) nur geringfügig geändert. Die Initiation der "frühen" Puffs wurde vollständig unterdrückt und es ist auch keine Ecdysteronbindung an diesen chromosomalen Loci durch eine entsprechende Fluoreszenzmarkierung nachweisbar. Lediglich an dem Intermoltpuff bei 68C konnte in allen Experimenten eine Intensitätsschwächung oder sogar eine vollständige Auslöschung der Fluoreszenz festgestellt werden.

Abb. 15: (folgende Seite)
Analyse von Speicheldrüsenchromosomen, die 2 Stunden in der Gegenwart von Ecdysteron (5×10^{-6} M) und Actinomycin D (2,57 µg/ml) inkubiert wurden. Die Ausschnittvergrößerung zeigt die Regression des Intermoltpuffs bei 68C, die bei diesen Inkubationsbedingungen erfolgen kann. Vergrößerung:870x

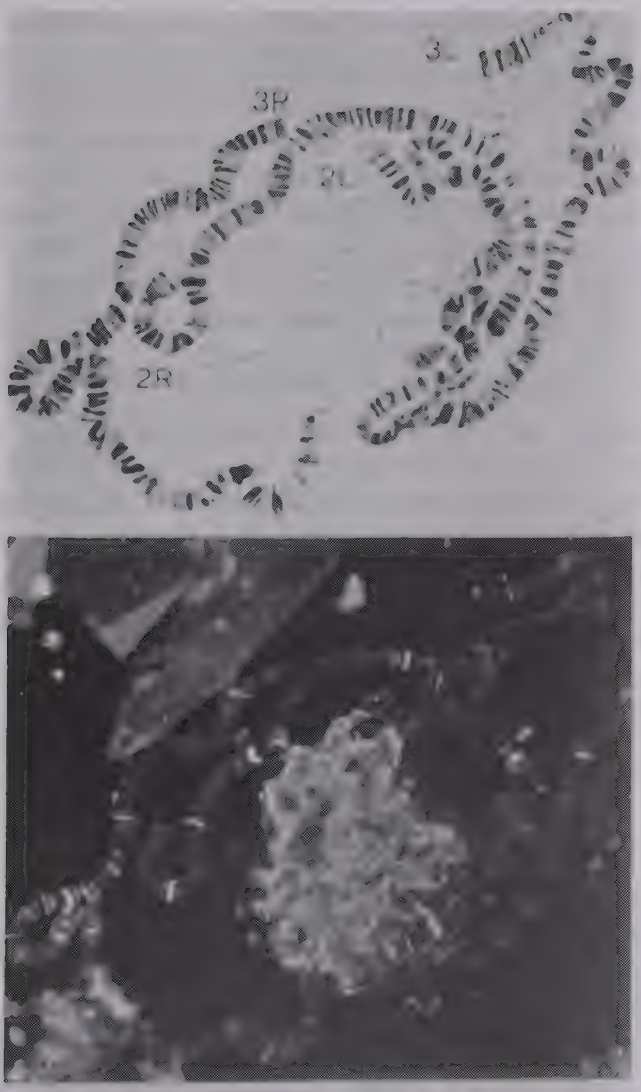

Abb. 15

3.6.3. Auswirkungen des Ecdysteronentzugs während der Speicheldrüsenentwicklung

Seit den *in vitro* Experimenten von Becker (41), Ashburner und Richards (18, 42, 43) ist bekannt, daß sich die reguläre Entwicklung des Puffmusters von Speicheldrüsenchromosomen, die durch eine anfängliche Inkubation in Gegenwart von Ecdysteron gestartet worden ist, durch einen sich anschließenden Entzug des Steroids ("Auswaschen") stark manipulieren läßt. Inwieweit hierbei auch die Ecdysteronbindung an die Chromosomen beeinflußt wird, sollten folgende Experimente zeigen:

3.6.3.1. Inkubation von PS1-Drüsen in ecdysteronfreiem Medium

Hierzu wurden Speicheldrüsen des Puffstadiums 1 nach dem Sezieren halbiert und eine Hälfte wurde in der Abwesenheit von Ecdysteron sofort bestrahlt und analysiert. Die zweite Hälfte wurde vor der Bestrahlung und der Analyse zunächst 2 Stunden in ecdysteronfreiem Grace's Medium inkubiert. Ein Vergleich der Puff- und Fluoreszenzmuster auf den Chromosomen der unterschiedlich behandelten Drüsenhälften zeigte, daß eine Inkubation von PS1-Drüsen in Abwesenheit von Ecdysteron zumindest in den ersten 2 Stunden keine signifikante Änderung der Muster hervorrief.

3.6.3.2. Auswirkungen des Steroidentzugs nach vorausgehender Inkubation der Speicheldrüsen in Gegenwart von Ecdysteron (18)

Hierzu wurden PS1-Drüsen zunächst 1 Stunde in Gegenwart von Ecdysteron (5×10^{-6} M) inkubiert, anschließend halbiert und eine Hälfte sofort bestrahlt und analysiert. Die zweite Hälfte wurde zunächst 2 bzw. 4 Stunden in ecdysteronfreiem Grace's Medium weiter inkubiert und erst dann belichtet und analysiert. Die nach einstündiger Inkubation sofort bestrahlten und analysierten Speicheldrüsenchromosomen zeigten immer das bereits

in Abb. 9 wiedergegebene Verteilungsmuster der Puffs und der Fluoreszenzen. Wie dieses Muster durch ein zweistündiges "Auswaschen" verändert wird, ist in Abb. 16 und Tab. 2 gezeigt.

Chromosom				
X	2L	2R	3L	3R
3A	22A	43EF	61C	82F
3C	28CD	47A	61F	85D
	29BC	50CD	61F	85D
	33EF	52C	63E	93F
	38B	58DE	63F	94F
			70E	97B
			76D	99EF

Tab. 2:
Auflistung der in Abb. 16 exemplarisch markierten chromosomalen Loci, die nach der Inkubation einer Speicheldrüse des Puffstadiums 3/4 in ecdysteronfreiem Medium eine Ecdysteronbindung zeigen.

Abb. 16: (folgende Seite)
Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse eines "Auswaschexperimentes". In dem oberen Teil der Abbildung ist das X-Chromosom und der linke Arm des Chromosoms 3 nach einstündiger Inkubation der Speicheldrüse in Gegenwart von 5×10^{-6} M Ecdysteron gezeigt (Puffstadium 3/4). Der untere Teil der Abbildung zeigt die drastische Veränderung des Puff- und Fluoreszenzmusters auf den Chromosomen nach zweistündiger Inkubation einer Speicheldrüse des Puffstadiums 3/4 in ecdysteronfreiem Medium. Vergrößerung: 800x

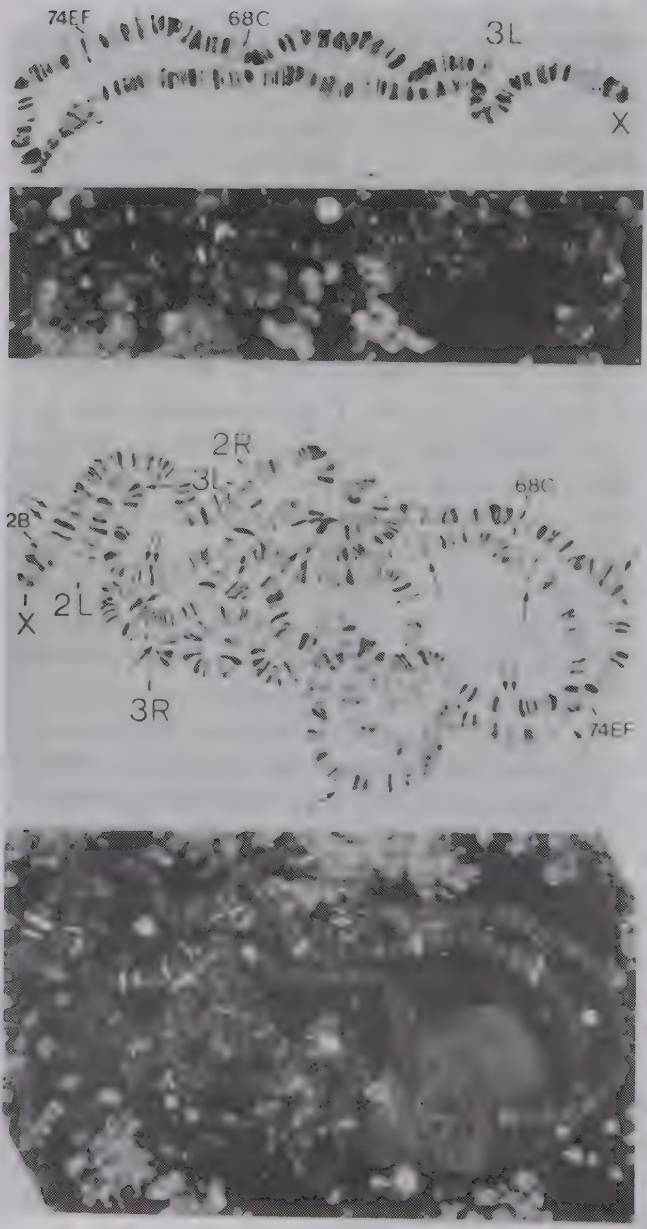

Abb. 16

Die Resultate dieser Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Nahezu alle in der ersten Stunde durch Ecdysteron induzierten Puffs kondensieren während des zweistündigen "Auswaschens" komplett (z. B. bei 2B5-6, 2B13-17, 74EF, 75B). An diesen Stellen läßt sich nach der Regression auch keine Fluoreszenzmarkierung mehr feststellen (Abb. 16).
- Der Intermoltpuff bei 68C, der während des zweistündigen "Auswaschens" ebenfalls kondensiert, kann durch das Absenken der exogenen Ecdysteronkonzentration nicht wieder aktiviert werden (Abb. 16).
- Auch nach mehrstündiger Inkubation der Speicheldrüsen in ecdysteronfreiem Medium kann an vielen chromosomalen Loci eine Steroidbindung nachgewiesen werden. Diese fluoreszenzmarkierten Loci lassen sich in vier Gruppen aufteilen:

  1. Chromosomenorte, die während der gesamten Entwicklung aktiv sind (z. B. bei 43E, 47A, 50CD),
  2. Chromosomenorte, die sowohl zu einem frühen Zeitpunkt (PS1) als auch zu einem sehr späten Zeitpunkt (ab PS15) aktiv sind und zwischendurch kondensieren (z. B. bei 3C, 52C, 58D),
  3. Chromosomenorte, die sowohl zum Ende der Larvenentwicklung (PS10) als auch während eines fortgeschrittenen Puppenstadiums (ab PS18) aktiv sind und zwischendurch kondensieren (z. B. bei 63E, 83F) und
  4. Chromosomenorte, die nur zu einem späten Zeitpunkt (frühestens ab PS17) aktiviert werden (z. B. bei 22 A, 93F).

Dieses Aktivitätsmuster läßt den Schluß zu, daß Puffs, die während der Speicheldrüsenentwicklung erst recht spät auftreten durch die Manipulation der exogenen Ecdysteronkonzentration (einstündige Anwesenheit anschließend zweistündige Abwesenheit des Steroids) vorzeitig induziert werden; dies wurde auch

bereits von Ashburner demonstriert (18).
Wie die Arbeiten von Richards (42, 43) zeigen, wird durch eine kontinuierliche Anwesenheit des Ecdysterons während der Inkubation der Speicheldrüsen die Initiation einiger dieser Puffs zu einem sehr späten Entwicklungszeitpunkt sogar inhibiert (z. B. bei 63E). Diese Puffs können in vitro nur durch diesen Auswaschschritt initiiert werden.

Durch eine Verlängerung der "Auswaschzeit" auf 4 Stunden wird diese Feststellung noch deutlicher. Als Beispiel ist in Abb. 1 der linke Arm des Chromosoms 3 gezeigt. Hier können wir gegenüber dem zweistündigen "Auswaschen" eine wesentlich stärkere Dekondensation an dem späten Genort 63E feststellen und eine beginnende Dekondensation an der Position 66B. Auch 76A zeigt nach einem vierstündigen "Auswaschen" eine stärkere Fluoreszenzmarkierung.

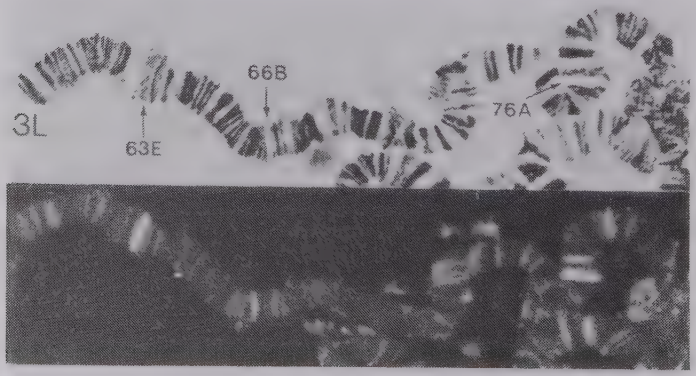

Abb. 17:
Analyse des linken Arms von Chromosom 3. Eine Speicheldrüse des Puffstadiums 1 wurde zunächst 1 Stunde in ecdysteronhaltigem Medium und anschließend 4 Stunden in ecdysteronfreiem Medium inkubiert. Details siehe Text; Vergrößerung: 1020x

Ein nahezu identisches Bild ergibt sich, wenn die anfängliche Inkubation in Gegenwart von Ecdysteron auf 4 Stunden ausgedehnt wird; auch hier betrug die "Auswaschzeit" 2 Stunden.
In Abb. 18 ist als Beispiel hierfür das X-Chromosom und wiederum der linke Arm von Chromosom 3 gezeigt. Diese Abbildung macht auch deutlich, daß auch eine weit fortgeschrittene Entwicklung an den Chromosomenorten 71DE, 72EF, 75B und 78D (vergleiche hierzu Abb. 11) durch die Inkubation der Drüse in ecdysteronfreiem Medium vollständig rückgängig gemacht werden kann.

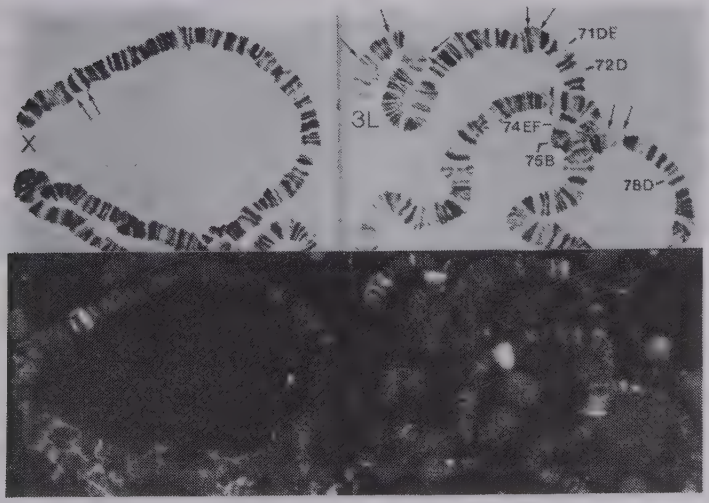

Abb. 18:
Analyse des X-Chromosoms und des linken Arms von Chromosom 3. Eine Speicheldrüse des Puffstadiums 1 wurde zunächst 4 Stunden in ecdysteronhaltigem Medium und anschließend 2 Stunden in ecdysteronfreiem Medium inkubiert. Vergrößerung: 720x

Zusammenfassend läßt sich aufgrund der oben beschriebenen Resultate sagen, daß die vorzeitige, mit einer Ecdysteronbindung gekoppelte, Induktion "später" Puffs durch die Inkubation in ecdysteronfreiem Medium zumindest bei relativ kurzen Inkubationszeiten (2 bis 4 Stunden) im großen Maße unabhängig von der jeweiligen Inkubationsdauer ist. Nach allen Experimenten (1h + Ecdysteron, 2h - Ecdysteron; 1h + Ecdysteron, 4h - Ecdysteron; 4h + Ecdysteron, 2h - Ecdysteron) ergaben sich identische Fluoreszenzverteilungsmuster auf den Chromosomen. Die Floureszenzen wiesen jedoch unterschiedliche Intensitätsverteilungen auf. Auch zytologisch waren Unterschiede, zum Beispiel eine unterschiedlich große Puffausbildung bei 63E, zu erkennen. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die weitreichende Umverteilung des Bindungsmusters vom Ecdysteron nur dann durch einen Steroidentzug im Inkubationsmedium eingeleitet werden kann, wenn die Drüse vorher in Gegenwart von Ecdysteron inkubiert worden ist.
Ähnliche Resultate lassen sich jedoch auch mit Drüsen erzielen, die sich in vivo, aufgrund des Anstiegs der Ecdysteronkonzentration beim Übergang von PS1 nach PS2, bis zum Puffstadium 3/4 entwickelt haben (42, 43).

3.6.3.3. Reinitiation der Speicheldrüsenentwicklung

Die durch das "Auswaschen" hervorgerufenen Effekte lassen sich zu einem großen Teil rückgängig machen, indem die so vorbehandelte Drüse wiederum in ecdysteronhaltigem Medium inkubiert wird (18). Es kommt zu einer erneuten, schnellen Ausbildung der Puffs an den chromosomalen Loci bei 71DE, 74EF, 75B und anderen, die zu einem recht frühen Zeitpunkt der Entwicklung aktiv sind. Das Auftreten dieser Puffs ist begleitet von der Regression nahezu aller, durch das "Auswaschen" vorzeitig induzierter Chromosomenorte (z. B. bei 63E; vergleiche hierzu Abb. 16, 17). In Abb. 19 ist dies wieder für den linken Arm des

Chromosoms 3 gezeigt; es wird auch deutlich, daß die erneute Puffauslösung wiederum mit der Ecdysteronbindung an diese spezifischen Chromosomenorte gekoppelt ist.

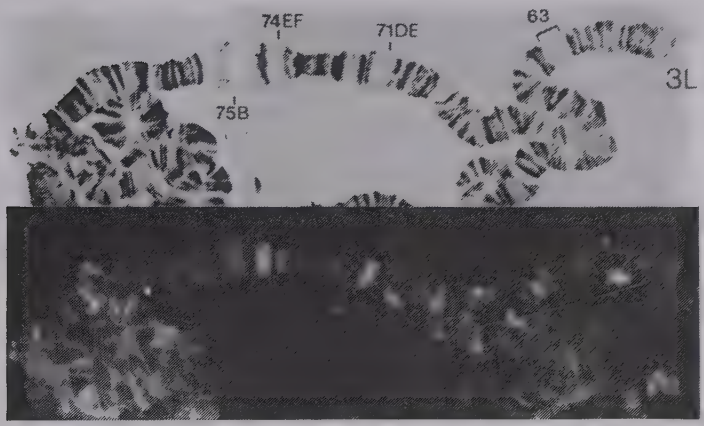

Abb. 19:
Analyse des linken Arms des Chromosoms 3 nach der einstündigen Inkubation in ecdysteronhaltigem Medium (Reinitiation). Vorausgegangen war eine zweistündige Inkubation dieser Drüse in ecdysteronfreiem Medium ("Auswaschen"). Zu Beginn dieses Auswaschschrittes hatte die Drüse das Puffstadium 3/4 erreicht. Vergrößerung: 900x

3.6.3.4. "Auswaschen" in Gegenwart von Cycloheximid

Die kontinuierliche Abfolge der einzelnen Puffstadien ab PS1 ist nicht nur an die RNA-Neusynthese gekoppelt, sondern in

komplexer Form auch von der Proteinbiosynthese abhängig (17, 18). Unter Einwirkung verschiedener Proteinbiosyntheseinhibitoren (Cycloheximid, Puromycin) kommt es in Gegenwart von Ecdysteron zwar zu einer ungehinderten Induktion vieler "früher" Puffs (z. B. bei 74EF und 75B), jedoch ist die sich normalerweise anschließende Regression dieser "frühen" Puffs und die Ausbildung vieler "später" Puffs (z. B. bei 22C, 82F, 3C) komplett inhibiert. Zu diesem Ergebnis kommt man sowohl in in vitro Experimenten, die in der ununterbrochenen Anwesenheit von Ecdysteron gemacht werden, als auch in den "Auswaschexperimenten" in Gegenwart von Cycloheximid.

In Abb. 20 ist das typische Ergebnis eines "Auswaschexperimentes" in Gegenwart von Cycloheximid (1h + Ecdysteron + Cycloheximid, 2h - Ecdysteron + Cycloheximid) für das X-Chromosom und den linken Arm des Chromosoms 3 gezeigt.

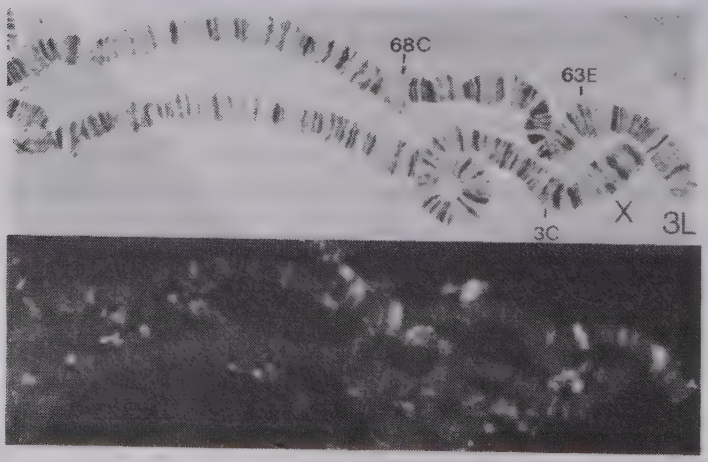

Abb. 20: Beeinflußung der, durch das "Auswaschen" initiierten, Veränderungen des Puff- und Fluoreszenzmusters auf dem X-Chromosom und dem linken Arm des Chromosoms 3 (siehe Abschn.3.6.3.2.) durch Cycloheximid. Details siehe Text 3.6.3.4.; Vergrößerung: 850x.

Wenn man das Puff- und Fluoreszenzverteilungsmuster auf diesen beiden Chromosomen vergleicht mit den Mustern auf Chromosomen aus einem ähnlichen Experiment, das jedoch in Abwesenheit von Cycloheximid durchgeführt wurde (Abschn.3.6.3.2.; Abb. 16), fallen deutliche Unterschiede auf:

- Die Regression und begleitende Fluoreszenzlöschung des Intermoltpuffs bei 68C ist inhibiert. Das Ausmaß dieser Inhibition ist abhängig von dem jeweiligen Präparat; häufig ist eine Fluoreszenzintensitätsminderung und beginnende Regression feststellbar.
- Die vorzeitige Induktion vieler "später" Puffs, hier als Beispiel bei 3C, ist komplett inhibiert und es läßt sich auch keine Fluoreszenzmarkierung feststellen. Dieses Ergebnis gilt auch für andere spät induzierte Genorte auf den anderen, hier nicht gezeigten, Chromosomen (z. B. bei 58D, 82F).
- Die Position 63E ist nur schwach dekondensiert, zeigt jedoch eine starke Fluoreszenzmarkierung; ebenso kann eine beginnende Dekondensation bei 78D mit begleitender Fluoreszenzmarkierung festgestellt werden.

3.6.4. "Wanderungsexperiment"

Aussagen über den Mechanismus der Puffinduktion und -regression lassen sich nur machen, wenn unter anderem das Verhalten des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes während dieses Vorganges beobachtet werden kann. Die Resultate des folgenden Experimentes, das auch Aussagen darüber erlaubt, inwieweit Zellen bzw. der Ecdysteron-Rezeptor durch die Bestrahlung geschädigt werden, geben wichtige Hinweise auf einen Teilbereich dieses Mechanismus.

PS1-Drüsen wurden direkt nach dem Sezieren in ecdysteronfreiem Medium bestrahlt (Kantenfilter WG335) und anschließend 2 Stunden in der Gegenwart von 5×10^{-6} M Ecdysteron inkubiert. Nach

der Inkubation wurden sie ohne weitere Belichtung immunofluoreszenzmikroskopisch analysiert. In Abb. 21 ist das Ergebnis, wiederum für den linken Arm des Chromosoms 3, zu sehen.

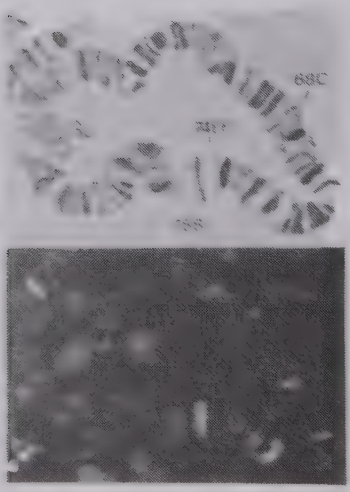

Abb. 21:
Nachweis, daß die Quervernetzung des Ecdysterons mit dem ecdysteronspezifischen Protein die biologische Wirksamkeit dieses Komplexes nicht beeinträchtigt.
Details siehe Text;
Vergrößerung: 1060x

Etwa 80 % der Speicheldrüsenzellen hatten sich trotz der Belichtung, bei der jedoch der kurzwellige Lichtanteil unterhalb von etwa 330 nm ausgeblendet werden mußte, während der sich anschließenden zweistündigen Inkubation normal entwickelt (vergleiche hierzu Abb. 10). Es kommt zu einer Initiation der "frühen" Puffs (z. B. bei 74EF und 75B) und zu einer Regressio des Intermoltpuffs bei 68C. Begleitet wird dies von einer entsprechenden Umverteilung des Fluoreszenzmusters.

Dieses Resultat zeigt, daß die Lebensfähigkeit der Drüsenzelle durch die Bestrahlung nur geringfügig beeinträchtigt wird und auch der Rezeptor nach der Quervernetzung mit Ecdysteron seine biologische Aktivität beibehält.

3.6.5. Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse der D. melanogaster Mutante ecd^1

Diese Mutante von D. melanogaster ist für die Beobachtung der ecdysteronabhängigen Entwicklung außerordentlich nützlich, da es möglich ist, die Ecdysteronkonzentration im lebenden Tier durch die Zuchtbedingungen entscheident zu beeinflußen (22). Hierzu wird der homozygote ecd^1-Stamm bis zum Eintritt in das dritte Larvenstadium bei 20 °C gehalten. Anschließend wird die Zuchttemperatur auf 29 °C erhöht. Durch diese Temperaturerhöhung wird die Ecdysteronneusynthese während des dritten Larvenstadiums vollständig blockiert und so eine Verpuppung mit anschließender Entwicklung zum adulten Tier verhindert. Die Larven wachsen bei 29 °C zu einer normalen Größe heran und verbleiben dann etwa 3 Wochen in diesem Stadium. Danach sterben sie ab. Dieser Umstand wird auch als Kontrolle für die Reinheit des Stammes verwendet. Die Entwicklung zum adulten Tier erfolgt jedoch auch bei der nicht permissiven Temperatur von 29 °C, wenn das fehlende Ecdysteron dem Tier exogen (durch Injektion oder Beimengung im Futter) zugeführt wird (22).

Da der Zeitpunkt, zu dem die Zuchttemperatur auf 29 °C erhöht werden muß, abhängig ist von der Entwicklungsgeschwindigkeit der Tiere, muß dieser für die jeweiligen Zuchtbedingungen (relative Luftfeuchtigkeit, Futter, Medium) jeweils neu bestimmt werden. Bei unseren Zuchtbedingungen entwickelten sich die Larven in 96 Stunden bis zum frühen dritten Stadium und wurden dann bei 29 °C weiter gehalten.
In Abb. 22 ist die immunofluoreszenzmikroskopische Analyse der Chromosomen dieser ecd^1-Mutante, gehalten bei der nicht permissiven Temperatur, gezeigt.

Obwohl die Ecdysteronkonzentration in dem Tier, das bei dieser erhöhten Temperatur gehalten wird, sehr niedrig ist, sind auf dem gesamten Chromosomensatz zwei Genorte (bei 53D und 97D) durch eine intensive Fluoreszenz markiert. Alle übrigen Markierungen liegen in ihrer Intensität weit unter der der Cytoplasmareste. Dieses Fluoreszenzverteilungsmuster ändert sich auch dann nicht, wenn die Tiere mehrere Tage bei der nicht permissiven Temperatur von 29 ^{o}C gehalten werden.

In Übereinstimmung mit den Analysen von Speicheldrüsenchromosomen des Puffstadiums 1 (Abschn. 3.6.1.; Abb. 8) bzw. der "Auswaschexperimente" (Abschn. 3.6.3.2.; Abb. 16) zeigt dieses Resultat, daß nicht alle ecdysteronsensiblen Gene erst durch eine hohe Ecdysteronkonzentration aktiviert werden. Da einige dieser Gene nur bei einer sehr niedrigen Ecdysteronkonzentration aktiv sind (sowohl in vivo als auch in vitro) wird deutlich, daß in D. melanogaster unterschiedliche Regulationsmechanismen für die Vielzahl der ecdysteronkontrollierten Gene existieren.

Abb. 22: (folgende Seite)
Immunofluoreszenzmikroskopische Analyse der Speicheldrüsenchromosomen der D. melanogaster Mutante ecd^{1};
Vergrößerung: 630x.

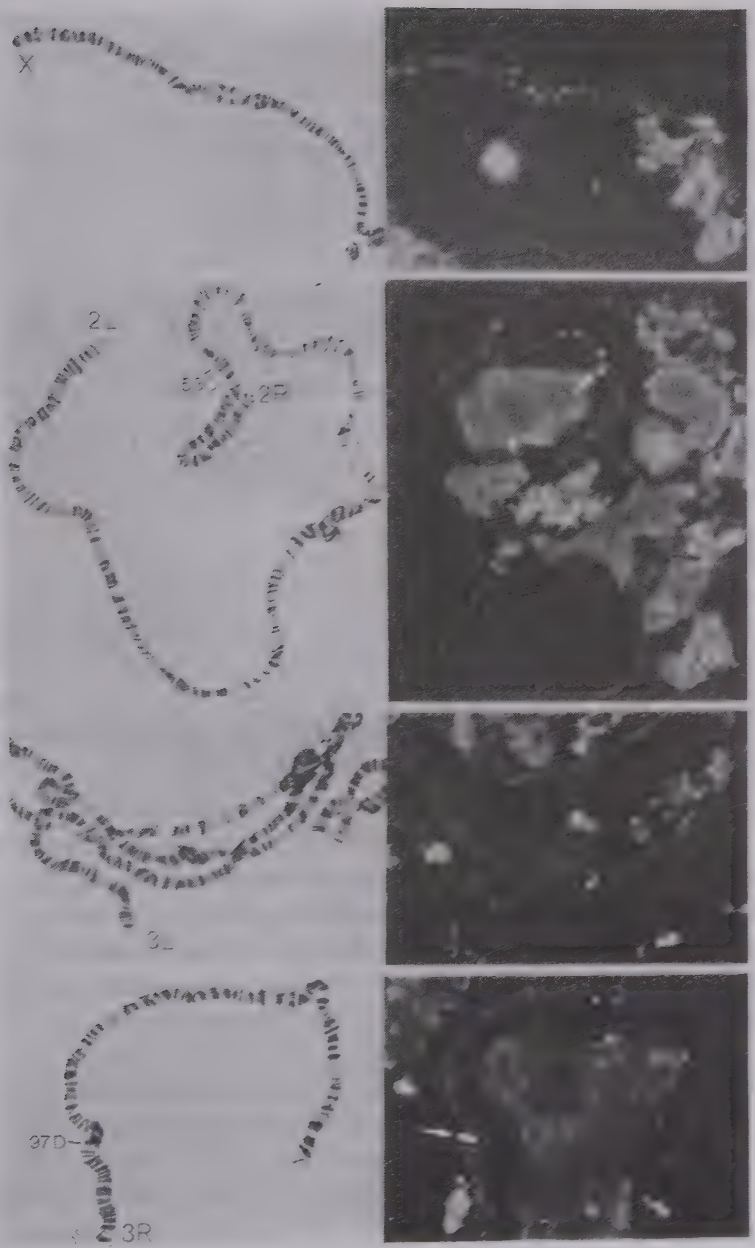

Abb. 22

4. DISKUSSION

Obwohl Insekten eine stark divergierende Gruppe von Lebewesen sind, erscheint die endocrinologische Kontrolle des Wachstums, der Häutungen und der abschließenden Metamorphose innerhalb dieser Gruppe sehr ähnlich zu sein (44, 45).

Die gerichtete Abfolge der einzelnen Stadien wird bestimmt durch das Zusammenwirken zweier Hormongruppen: dem, den Sesquiterpenoiden zugehörenden Juvenilhormonen und den Ecdysteroiden. Während der gesamten Entwicklung bis zum adulten Tier schwanken beide Hormonkonzentrationen beträchtlich und ermöglichen so eine Variation des jeweiligen Einflußes auf die Entwicklung (39, 46, 47).

Zu jeder Häutung steigt die Ecdysteronkonzentration in der Hämolymphe stark an. Ob diese Häutung jedoch in ein weiteres Larvenstadium führt oder in das Puppenstadium mit der darauffolgenden Metamorphose, hängt ab von der Wirkung einer wesentlich geringeren Ecdysteronausschüttung, die allen Häutungen vorangeht. Wird die Ecdysteronwirkung zu diesem Zeitpunkt von der gleichzeitigen Anwesenheit der Juvenilhormone beeinflußt, kommt es zu einer Larven-Larven-Häutung; fehlen die Juvenilhormone, entwickelt sich während der folgenden Häutung eine Puppe. Daher werden die Juvenilhormone gelegentlich als "status quo"-Hormone bezeichnet, da sie offensichtlich bestrebt sind den jeweiligen Entwicklungszustand eines Organismus aufrechtzuerhalten.

Während für das Ecdysteron eindeutig nachgewiesen worden ist, daß das Hormon mit dem Chromatin der Zielzellen wechselwirkt und die Genexpression direkt beeinfluß (20, 21), ist dies für das Juvenilhormon bisher nicht beweisbar. Der Nachweis eines

cytoplasmatischen Juvenilrezeptors in der Hypodermis von D. melanogaster (48) bzw. in K_c-Zellen (49) und die juvenilhormonabhängige Wanderung eines ähnlichen Rezeptors in den Zellkern in der Epidermis von Manduca sexta (50), macht eine direkte Chromatinwechselwirkung jedoch sehr wahrscheinlich. Auch ist für beide Hormone nachgewiesen, daß es in völliger Analogie zur hormongesteuerten Genexpression in Säugetierzellen (2), unter ihrem Einfluß zur Produktion einer jeweils hormonspezifischen m-RNA-Population kommt (51-53). Kurz danach treten die ersten Proteinprodukte dieser hormonabhängig synthetischen m-RNA-Moleküle auf (54-59).

Diese Proteine lassen sich gemäß ihrer postulierten Funktion zumindest in drei, prinzipiell unterschiedliche Klassen, einordnen.

- Proteine wie z. B. das Insectocyanin (60) in Manduca sexta (Produktion unter Juvenilkontrolle) oder das Vitellogenin (61) in D. melanogaster (Produktion unter Ecdysteronkontrolle),
- Proteine, die in den Stoffwechsel der Zellen eingreifen (62) und somit einen hormonabhängigen, sekundären Effekt ausüben (z. B. Enzyme) und
- Proteine, die wiederum zur Aktivierung von hormonabhängigen Genen beitragen.

In dem letzten Fall, der sich nur auf die Steroidhormone bezieht und der in der folgen Diskussion noch weiter ausgeführt wird, erkennen wir den Beginn eines hierarchisch geordneten Kaskadenmodells der hormonabhängigen Genregulation. Eine genaue Beschreibung dieser Regulation, aufgrund der molekularen Ereignisse auf dem Chromatin, ist bisher jedoch nur in Ansätzen möglich, da viele Parameter (m-RNAs, Genprodukte, isolierte Gene) experimentell noch nicht zugänglich sind. Auch die Frage wie sich die beiden Hormonwirkungen gegenseitig beeinflussen ist bisher ungeklärt, da eine Abgrenzung der Einzeleinflüsse im lebenden Tier schwierig ist.

Einige Experimente, die in den letzten Jahren durchgeführt worden sind, haben aber gezeigt, daß die direkte Kontrolle der Genexpression, die eine Chromatinbindung der Hormone beinhaltet, ergänzt wird durch weitere Effekte, die die Steroide innerhalb der Zielzellen hervorrufen. Diese genomunabhängigen Wirkungsorte liegen sowohl im Cytoplasma und beeinflußen hier z. B. die Translatierbarkeit bzw. Stabilität bestimmter m-RNA-Moleküle (63) als auch in der Zellmembran (87).

Ähnlich wie bei den Peptidhormonen, die entweder auf Membranenzyme (z. B. Adenylat-cyclase) wirken und/oder das Kationtransportsystem der Membran beeinflußen, konnte nachgewiesen werden, daß Steroide über eine Zellmembranwechselwirkung Einflüsse auf das Zellinnere ausüben (64). Als Beispiel hierfür kann die Progesteron induzierte Meiose während der Reifung von Xenopus laevis-Oocyten angeführt werden. Diese Meiose kann auch dann induziert werden, wenn das Progesteron während der Oocyteninkubation an ein Makromolekül gebunden ist, das ein Eindringen des Steroids in die Zelle verhindert. Die Wirkung des Progesterons (Einleitung der Meiose) muß daher über eine Zellmembranwechselwirkung ausgeübt werden. Durch die Injektion des calciumspezifischen Photoproteins Aequorin in X.laevis Oocyten und anschließender Inkubation dieser Oocyten mit Progesteron, konnte nachgewiesen werden, daß wenige Sekunden nach dem Inkubationsbeginn die Calciumkonzentration innerhalb der Oocyten ansteigt (65). Gleichzeitig konnte in den Zellen ein calciumbindendes Protein der Calmodulinklasse nachgewiesen werden (66).

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, daß eine sehr schnelle Wirkung des Progesterons die Beeinflussung des Ca^{2+}-Transportsystems innerhalb der Zellmembran ist. Ob jedoch diese zellmembrangebundene Wirkung des Progesterons auch die Steroidwirkung innerhalb der Zelle beeinflußt (z. B. die Bindung an das Chromatin) ist fraglich.

Bei in vitro Inkubationsexperimenten von Speicheldrüsen von Chironomus thummi und C.tentans konnte ebenfalls gezeigt werden, daß auch in Abwesenheit exogenen Ecdysterons, nur durch Veränderungen der Ionenkonzentration des Inkubationsmediums, morphologische Veränderungen der Chromosomen (Puffs) induziert werden können, die normalerweise unter Ecdysteroneinwirkung hervorgerufen werden (67, 68). Zusätzlich konnte demonstriert werden, daß unter Ecdysteroneinwirkung das Zellmembranpotential dieser Speicheldrüsen signifikant verändert wird (69). Obwohl die Interpretation der Resultate umstritten ist (70), geben sie Hinweise darauf, daß neben der Wechselwirkung mit dem Genom, Steroide offensichtlich in der Lage sind, zelluläre Vorgänge zu beeinflussen, ohne direkt an der Genaktivierung oder -desaktivierung beteiligt zu sein, diese jedoch über eine sekundäre Wirkung möglicherweise stark beeinflussen können.

Für die Untersuchung der molekularen Vorgänge der steroidabhängigen Genregulation auf dem Chromatin, ist die Gruppe der Dipteren besonders geeignet, da sie in einigen Organen (z. B. Speicheldrüsen) über Chromosomen verfügen, die sich durch aufeinanderfolgende Replikationsschritte so vergrößert haben (Polytänisierung), daß sie durch ein Mikroskop leicht beobachtet werden können. Auf diesen Chromosomen lassen sich drei unterschiedlich strukturierte Organisationszustände des Chromatins feststellen: Banden, Interbanden und Puffs. Die Puffs sind eine reversible, strukturelle Modifikation der Banden und ein bevorzugter Ort der RNA-Biosynthese (14, 53, 71).

Im Jahre 1959 konnte Becker (9) demonstrieren, daß die regelmäßigen Veränderungen der Puffverteilung auf den Speicheldrüsenchromosomen, die kurz vor Beginn der Verpuppung einsetzen, abhängig sind von einem endogenen Faktor, der 1960 von Clever und Karlson (7) eindeutig als Ecdysteron identifiziert wurde.

In der folgenden Zeit wurden drei umfangreiche Untersuchungen über diese wechselnden Puffmuster der Speicheldrüsenchromosomen von D. melanogaster durchgeführt (9-12, 26, 72). Ein großer Fortschritt für solche Untersuchungen war die Einführung der in vitro Kulturtechnik von Speicheldrüsen (15). Mit dieser Technik ist es möglich die Entwicklung der Speicheldrüsenchromosomen in vitro mit einer hohen Präzision nachzuvollziehen und sie durch Veränderungen der Inkubationsbedingungen stark zu beeinflussen.

Die Untersuchungen der in vivo Entwicklung der Speicheldrüsenchromosomen und die Resultate der Inkubationsexperimente können wie folgt zusammengefaßt werden.

- Die bis zur Ausbildung der Vorpuppe aktiven Puffs, deren Abfolge zwingend ist, lassen sich in drei Gruppen aufteilen (56):

  Intermoltpuffs (z. B. bei 3C, 25B, 68C)
  Diese sind aktiv während des dritten Larvenstadiums und bilden sich schnell zurück, wenn die Ecdysteronkonzentration für die Larven-Puppen-Häutung ansteigt.

  "frühe" Puffs (z. B. bei 23E, 74EF, 75B)
  Diese Puffs bilden sich innerhalb weniger Minuten nach dem Anstieg der Ecdysteronkonzentration und kondensieren, auch in Gegenwart von Ecdysteron, wiederum nach einigen Stunden.

  "späte" Puffs (z. B. bei 63E, 78D, 82F)
  Die Ausbildung dieser Puffs erfolgt erst einige Stunden nach Anstieg der Ecdysteronkonzentration und erreicht zu verschiedenen Zeiten ein Maximum.

- Unter Einfluß von Proteinbiosyntheseinhibitoren (17) ist die Ausbildung der "frühen" Puffs (Ausnahme bei 23E) nicht behindert; eine Regression dieser Puffs in Gegenwart von Ecdysteron und die "späte" Puffinduktion ist jedoch komplett blockiert.

- Werden Drüsen zu einem Zeitpunkt, zu dem die "frühen" Puffs noch aktiv sind in ecdysteronfreiem Medium inkubiert (18), bilden sich die "frühen" Puffs proteinbiosyntheseunabhängig sehr schnell zurück und die "späten" Puffs (bei 22C, 63E, 82F; Ausnahmen: unter anderem bei 62E, 78D) werden, im Vergleich zu der in vivo Entwicklung, vorzeitig initiiert. Durch eine Reinkubation in ecdysteronhaltigem Medium wird dieser Prozess rückgängig gemacht.

Aufgrund dieser Beobachtungen formulierten Ashburner und seine Mitarbeiter (19) folgendes Modell der ecdysteronabhängigen Genregulation in D. melanogaster:

In den Zielzellen (hier z. B. Speicheldrüsenzellen) wird das Ecdysteron von einem spezifischen Rezeptorprotein erkannt, reversibel gebunden und der Gesamtkomplex transloziert in den Kern. Hier bindet der Komplex sofort an alle ecdysteronabhängigen Gene und übt dabei zwei unterschiedliche Funktionen aus:

- eine positive Kontrolle über die "frühen" Puffs, hierdurch werden sie sofort initiiert;
- eine negative Kontrolle über die "späten" Puffs; hierdurch wird die Puffauslösung blockiert.

Mit größer werdender Konzentration kompetieren nun die Genprodukte der "frühen" Puffs immer stärker mit dem chromatingebundenen Ecdysteronrezeptor, verdrängen ihn schließlich und binden selber an diese Stellen. Dies hat wiederum zwei unterschiedliche Folgen:

- es kommt zu einer Regression der "frühen" Puffs (negative Kontrolle) und
- die "späten" Puffs werden initiiert (positive Kontrolle).

Wird die Proteinbiosynthese zu einem frühen Zeitpunkt der Ecdysteroneinwirkung inhibiert, kann es zwar zu einer Ausbildung

der "frühen" Puffs kommen, aber da die Synthese der frühen Genprodukte blockiert ist, können diese auch nicht mit dem Rezeptor um die gemeinsame Chromatinbindungsstelle kompetieren. Daraus folgt, daß die Regression der "frühen" Puffs und die Initiation der "späten" Puffs nicht stattfinden kann. Wird dagegen zu einem Zeitpunkt, zu dem die "frühen" Puffs noch aktiv sind die exogene Ecdysteronkonzentration gesenkt, zerfällt der Steroid-Rezeptorkomplex schnell. Somit verliert er die positive Kontrolle über die "frühen" Puffs und deren Regression wird sofort eingeleitet. Da gleichzeitig auch die negative Kontrolle über die "späten" Puffs wegfällt, reicht die bis zu diesem Zeitpunkt erzeugte Genproduktkonzentration der "frühen" Puffs aus, um die "späten" Puffs vorzeitig zu initiieren.

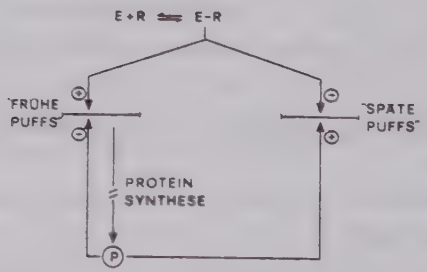

Abb. 23:

Modell der Aktivierungskontrolle "früher" und "später" Puffs in D. melanogaster (19).

Mit diesen, von Ashburner bewußt einfach formulierten, Modellvorstellungen ist es möglich einige morphologische Veränderungen auf den Speicheldrüsenchromosomen während der Entwicklung bis zur Vorpuppe zu erklären. Er nahm dabei in Kauf, daß Aktivierungen vieler Puffs (z. B. bei 78D) durch dieses Modell nicht erklärbar sind und eine Ausdehnung dieser Vorstellungen auf die recht komplexe Entwicklung des Puffmusters in der Vorpuppe,

während der ein großer Teil derselben Puffs noch einmal aktiviert werden, nur unter großen Schwierigkeiten möglich ist.

Dieses Modell impliziert, daß
- der Ecdysteron-Rezeptorkomplex direkt mit dem Chromatin wechselwirkt,
- er zu allen ecdysteronabhängig induzierten Genen eine gleich hohe Affinität hat,
- er sowohl positive als auch negative Kontrolleigenschaften hat und
- er in vivo außerordentlich schnell dissoziiert, wenn die exogene Ecdysteronkonzentration absinkt.

Im Jahre 1980 gelang es Gronemeyer und Pongs (20) die direkte, spezifische Bindung von Ecdysteron an polytäne Chromosomen von D. melanogaster nachzuweisen. Dieser Nachweis basiert auf der indirekten Immunofluoreszenzmikroskopie mit anti-Ecdysteron-Antikörpern. Durch Immunofluoreszenzstudien von Quetschpräparaten polytäner Chromosomen war es bereits vorher möglich, Aufschlüsse über die Verteilung chromosomaler Proteine zu erhalten (73-75). Es war jedoch nicht möglich, kleine reversibel gebundene Moleküle wie das Ecdysteron zu lokalisieren (76), da sie während des Fixierens und der nachfolgenden Waschschritte von dem Bindungsort abdissoziierten.

Der Nachweis war erst möglich nachdem es Gronemeyer gelang, in Analogie zur photochemischen Affinitätsmarkierung, das reversibel gebundene Ecdysteron durch eine Photoaktivierung an hochaffine Stellen auf dem Chromatin querzuvernetzen.

Mit Hilfe dieser photochemischen Quervernetzung, die auch auf andere Systeme außerordentlich erfolgreich übertragen wurde (77-81), gelang nicht nur der Nachweis der direkten Ecdysteronbindung auf dem Chromatin, sondern auch die Identifizierung

und Charakterisierung des Proteins, das mit dem Ecdysteron innerhalb der Speicheldrüsen von D. melanogaster und K_c-Zellen vernetzt wird (21). Hinsichtlich der Hormonbindungseigenschaften, der Translokation in den Kern und der Sedimentationskoeffizienten besitzt es die typischen Eigenschaften eines Hormonrezeptormoleküls.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Ergebnisse ergänzt durch eine Untersuchung der Bindung des Ecdysterons an Loci von Speicheldrüsenchromosomen während einer in vitro Simulation der Larvenentwicklung von D. melanogaster bis zur Ausbildung zur Vorpuppe. Weiterhin wird untersucht, wie das Verhalten des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes durch unterschiedliche in vitro Inkubationsbedingungen der Speicheldrüsen beeinflußt wird.

Wie bereits in Abschn. 3.4.1. diskutiert, ist der Nachweis des an das Chromatin quervernetzten Ecdysterons mit der indirekten Immunofluoreszenzmikroskopie nur dann eindeutig, wenn bewiesen werden kann, daß das verwendete Kaninchenserum nur ecdysteroneigene Determinaten auf den Chromosomen erkennt. Diese Spezifität des Serums konnte nicht nur durch die in Abschn. 3.4.1. aufgelisteten Experimente und einer von Dr. H. Gronemeyer durchgeführten radioimmunologischen Analyse bewiesen werden (27), sondern auch durch die Arbeiten von K. Schaltmann (21). Sie konnte zeigen, daß kein lösliches Protein der Speicheldrüsen von D. melanogaster bzw. aus K_c-Zellen mit dem ecdysteronspezifischen Kaninchenserum kreuzreagiert und daß nach der photochemischen Quervernetzung, das Ecdysteron in Speicheldrüsen bzw. K_c-Zellen nur an eine lösliche Proteinspezies gebunden ist. Nicht zuletzt aufgrund dieser Resultate können wir, nach Anwendung der indirekten Immunofluoreszenztechnik, mit großer Sicherheit Aussagen über die Lokalisation des Ecdysterons auf den polytänen Speicheldrüsenchromosomen machen.

Viele Aussagen der vorliegenden Arbeit über das Verhalten und die Lokalisation des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes stehen im Widerspruch zu dem aus Ashburners Modell abzuleitendem, hypothetischen Verhalten dieses Komplexes. Sowohl die immunofluoreszenzmikroskopische Analyse von Speicheldrüsen des frühen dritten Larvenstadiums (PS1, Abb. 8, Tab. 1) als auch der Auswaschexperimente (Abb. 16, Tab.2) zeigen, daß ein Ecdysteron-Rezeptorkomplex auch dann vorhanden ist und aktiv in die Genregulation eingreift, wenn die Ecdysteronkonzentration außerordentlich niedrig ist.

Gestützt wird diese Aussage durch Resultate, die Kobus und Gronemeyer, unabhängig voneinander, gefunden haben. Sie konnten zeigen, daß es nicht möglich ist, aus K_c-Zellen hochaffin gebundenes Ponasteron A (ein hochwirksames Ecdysteronanalogon) nur durch das Absenken der exogenen Steroidkonzentration herauszulösen; während das freie bzw. niedrigaffin gebundene Steroid sehr schnell aus der Zelle diffundierte, konnte das im Zellkern gebundene Ponasteron A auch durch mehrstündiges Waschen nicht entfernt werden. Die Halbwertszeit des einmal gebildeten und in den Zellkern translozierten Steroid-Rezeptorkomplexes ist offensichtlich wesentlich länger als bisher angenommen und schnellablaufende Genregulationsschritte lassen sich daher über eine Dissoziation des Hormon-Rezeptorkomplexes nicht erklären.

Die Feststellung der kontinuierlichen Anwesenheit des Steroid-Rezeptorkomplexes während der gesamten untersuchten Entwicklungsphase von D. melanogaster, wirft jedoch zwei Fragen auf:

- welche zusätzlichen Faktoren sind neben dem Hormon-Rezeptorkomplex für die entwicklungsstadienspezifische Aktivierung der Gene verantwortlich und
- welche Funktion haben die starken Veränderungen der Ecdysteronkonzentration, wenn sie für die Rezeptorbeladung nicht nötig sind?

Aus den bisher bekannten Daten lassen sich diese beiden Fragen nicht schlüssig beantworten; es ist jedoch möglich, drei unterschiedliche Thesen zu formulieren in deren Rahmen die streng geordnete Aktivierung der Gene während der Entwicklung von D. melanogaster, trotz der kontinuierlichen Anwesenheit des Steroid-Rezeptorkomplexes, erklärbar wird:

1. Die Konzentration des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes bleibt während der gesamten Entwicklung konstant. Er wird jedoch stadienspezifisch modifiziert und dadurch in seiner Selektivität, d.h. in seiner Fähigkeit bestimmte Chromatinbereiche zu aktivieren, verändert.
2. Das Chromatin wird stadienabhängig so verändert, daß jeweils nur bestimmte Bereiche (Gene) durch einen gleichbleibenden Rezeptorkomplex aktivierbar sind.
3. Die Konzentration des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes ändert sich mit der Ecdysteronkonzentration und die Chromosomenloci haben eine unterschiedliche Affinität zu diesem Gesamtkomplex. Bei niedriger Komplexkonzentration ist er nur an die hochaffinen Stellen gebunden; steigt die Konzentration an, können auch niedrigaffine Chromosomenbereiche aktiviert werden.

Durch die Kombination einer dieser Thesen mit den Resultaten der immunofluoreszenzmikroskopischen Analysen der Ecdysteronbindungsorte auf den Chromosomen, lassen sich die Aktivitätsänderungen der chromosomalen Loci während der Entwicklung von D. melanogaster wie folgt erklären:

Die Aktivitätsänderungen werden eingeleitet durch den hohen Anstieg der Ecdysteronkonzentration im späten dritten Larvenstadium. Kurz nach der Verpuppung fällt diese wieder drastisch ab und steigt zum Ende der Vorpuppenzeit erneut an. Vor dem ersten Anstieg aktiviert der vorhandene Hormon-Rezeptorkomplex einige Intermoltpuffs (Abb. 8, Tab. 1), deren Gene unter anderem die m-RNA-Moleküle der "Glue"-Proteine kodieren (3C (82), 68C (83)).

Steigt die Ecdysteronkonzentration nun an (PS1/2) werden die Chromatinbereiche der "frühen" Puffs aktivierbar. Dies führt zu einer Bindung des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes an diese Stellen (Abb. 8, Tab. 1) und nach der Transcription dieser Gene zum Auftreten der "frühen" Genprodukte. Einige dieser Genprodukte haben regulatorische Funktionen und beeinflussen entscheidend die Aktivierbarkeit chromosomaler Loci; es ist jedoch ungeklärt, ob hierfür eine direkte Chromatinbindung erforderlich ist.

Insgesamt lassen sich zumindest drei unterschiedliche Funktionen feststellen:

- Ihre Anwesenheit führt zu einer Regression der Intermoltpuffs (negative, rückwärtige Kontrolle). Für den Puff bei 68C konnte dies durch die Auswaschexperimente in Gegenwart von Cycloheximid eindeutig gezeigt werden (Abb. 20). Auch Experimente mit D. melanogaster-Mutanten, die über eine Deletion in einem durch Ecdysteron sehr früh induzierbaren Gen bei Loci 2B5 verfügen, stützen diese Aussage (84). Aufgrund dieser Deletion und darausfolgend Mangel an Genprodukt, ist eine Regression des Intermoltpuffs bei 68C auch nach sechsstündiger Anwesenheit von Ecdysteron nicht möglich.
- Die steigende Konzentration dieser Genprodukte führt nach einigen Stunden zu der, auch von Ashburner postulierten, Regression der "frühen" Puffs (Autoregulation). Dies wird nicht nur durch die Inkubationsexperimente in Gegenwart von Cycloheximid bewiesen, sondern auch durch neue Untersuchungen an D. melanogaster-Mutanten (85). Bei diesen Mutanten war die Genzahl der "frühen" Puffs bei 74EF und 75B entweder verdoppelt oder halbiert worden. Als Konsequenz hiervon variiert die Aktivitätszeit dieser "frühen" Puffs in der vorausberechneten Weise: halbierte Genzahl ⇒ verlangsamter Anstieg der Genproduktkonzentration ⇒ Verdoppelung der Genaktivitätszeit;

verdoppelte Genzahl ⇒ verlangsamter Anstieg der Genproduktkonzentration ⇒ Halbierung der Genaktivitätszeit.

- Die dritte, regulierende Funktion dieser Genprodukte ist die Initiation der "späten" Puffs (positive Verwärtskontrolle). Dies geschieht aber, im Gegensatz zu Ashburners Modell, in Kooperation mit dem ebenfalls beteiligten Rezeptorkomplex (Abb. 11, 12; Tab. 1). Dieses Kooperationsgebot für zwei Faktoren, das für die Initiation der "frühen" Puffs nicht gilt, erklärt auch den für die beiden Puffklassen unterschiedlichen Kurvenverlauf, der den Zusammenhang zwischen Ecdysteronkonzentration und Puffinduktion angibt (16). Während die "frühen" Puffs in einem weiten Konzentrationsbereich (10^{-9} bis 10^{-6}M Ecdysteron) durch eine Initiation reagieren, zeigen die "späten" Puffs, bezüglich der Ecdysteronkonzentration, eine nahezu übergangslose "alles oder nichts"-Reaktion. Als Analogie für diese unterschiedlichen Aktivitätsmechanismen kann die unterschiedliche Regulation des lac-Systems gegenüber der, der Lambda-Expression in E. coli gelten (86). Die Kurvenverläufe für den Zusammenhang zwischen Regulatorkonzentration und der jeweils regulierten Genexpression sind den oben, für das Ecdysteronsystem erwähnten, sehr ähnlich, da auch hier unterschiedliche Kooperativitäten der Regulation vorliegen.

Während die Resultate der Cycloheximidexperimente vollständig in das oben skizzierte Regulationsmodell hineinpassen, sind die Genaktivierungsmuster der "Auswaschexperimente" wesentlich schwieriger zu erklären.

Als Folge des Absenkens der exogenen Ecdysteronkonzentration entwickelt sich eine Speicheldrüse, die bereits einer hohen Steroidkonzentration ausgesetzt war (in vivo oder in vitro), sprunghaft in ein "spätes" Puffstadium. Erkennbar ist dies an der, gegenüber der in vivo Entwicklung, vorzeitigen Induktion "später" Puffs. An dieser

Induktion ist wiederum der Ecdysteron-Rezeptorkomplex, der unter diesen Bedingungen offensichtlich nicht dissoziiert, beteiligt. Wie gut dieses späte Stadium ausgeprägt ist, hängt von der Aktivitätsdauer der "frühen" Puffs ab; dies kann jedoch teilweise kompensiert werden durch eine längere "Auswaschzeit" in der zwar, wegen der sofort erfolgenden Regression der "frühen" Puffs, keine neuen m-RNA-Moleküle mehr produziert werden, aber die Translation der bereits vorhandenen weitergeführt wird. Auch hier ist also eine klare Abhängigkeit der Entwicklungsgeschwindigkeit von der Konzentration der "frühen" Genprodukte vorhanden. Weitere Hinweise für die Beteiligung dieser Genprodukte an der vorzeitigen Induktion der "späten" Puffs geben sowohl die "Auswaschexperimente" in Gegenwart von Cycloheximid (Abb. 20), bei denen diese vorzeitige Induktion blockiert ist (z. B. bei 3C), als auch die "Auswaschexperimente" von Speicheldrüsen des Puffstadiums 1; auch hier kommt es zu keiner vorzeitigen Induktion.

Eine genaue Bestimmung des durch das "Auswaschen" erreichten Puffstadiums ist nicht möglich, da die zu diesem Zeitpunkt für die Speicheldrüse unnatürliche Erniedrigung der exogenen Ecdysteronkonzentration offensichtlich nicht in ein definiertes, für alle Chromosomen geltendes Puffstadium führt. Wenn man die Auflistung der unter diesem Umständen aktiven Puffs (Tab. 2) jedoch mit Tabellen vergleicht, in denen die zeitabhängigen Puffaktivierungen wiedergegeben sind (11), erkennt man, daß dieses Puffmuster nicht dem, von Ashburner angegebenen, larvalen Stadium (PS9/10) entspricht (18), sondern mehr einem Puffstadium der Vorpuppenzeit (etwa PS18). Zu diesem Zeitpunkt ist die Ecdysteronkonzentration auch im Tier außerordentlich niedrig (39). Das larvale Stadium, das diesem sehr ähnelt, wird anscheinend übersprungen.

Wie in Abschn. 3.6.3.2. bereits beschrieben, werden durch das Absenken der exogenen Ecdysteronkonzentration drei Gruppen chromosomaler Loci aktiviert:

1. Puffs, die nur während einer sehr niedrigen Ecdysteronkonzentration ausgebildet werden (z. B. bei 3C, 52C, 58D), d. h. während des mittleren dritten Larvenstadiums vor dem ersten Konzentrationsanstieg des Ecdysterons und etwa ab PS15 wenn die Ecdysteronkonzentration wieder fällt. Möglicherweise sind nur an der zweiten Aktivierung regulatorische Proteine beteiligt (z. B. bei 3C).

2. Puffs, die nur während des zweiten Konzentrationsminimums des Ecdysterons auftreten (z. B. bei 22A, 93F). Das Fehlen der regulatorischen Proteine während des mittleren dritten Larvenstadiums verhindert zu diesem Zeitpunkt, trotz der niedrigen Ecdysteronkonzentration, die Aktivierung dieser Loci.

3. Puffs, die sowohl während der hohen Ecdysteronkonzentration bei PS10 als auch während der sehr niedrigen Ecdysteronkonzentration bei PS17 aktiv sind (z. B. bei 63E, 82F). Dieses Verhalten könnte durch die Anwesenheit unterschiedlicher, regulatorischer Proteine erklärt werden, die diese Chromatinbereiche zu den verschiedenen Zeitpunkten kontrollieren. Es ist jedoch auch möglich, daß zwei unterschiedlich regulierte Gene, die sehr eng benachbart sind, Puffs ausbilden, die bei der optischen Auflösung des verwendeten Mikroskops und der herkömmlichen Fixier- und Quetschtechnik von Chromosomen morphologisch nicht unterscheidbar sind.

Wichtige Aufschlüsse über das Verhalten des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes bei der Puffinduktion bzw. der -regression können aus den Resultaten der "Wanderungsexperimente" gewonnen werden (Abschn. 3.6.4., Abb. 21). Bei diesen Experimenten war innerhalb

von Speicheldrüsen des Puffstadiums 1 zunächst der Rezeptor mit dem Ecdysteron photochemisch quervernetzt worden; die Speicheldrüsen wurden anschließend 2 Stunden in Gegenwart von Ecdysteron inkubiert.

Obwohl der Rezeptor kovalent mit dem Ecdysteron verbunden ist, kommt es während der Inkubation zur Regression bzw. Initiation von Puffs (z. B. bei 68C bzw. 74EF, 75B), die völlig analog zu der normalen Entwicklung im unbelichteten Zustand verläuft. Dies Verhalten kann nur so interpretiert werden, daß die Regression eines Puffs nicht durch die Dissoziation des Hormon-Rezeptorkomplexes auf der Chromatinebene eingeleitet wird, sondern daß der Komplex als vollständige Einheit von dieser Stelle wegwandert; ebenso wandert er als Einheit an eine neu zu aktivierende Chromatinstelle hin. Aufgrund der Experimente kann es auch ausgeschlossen werden, daß der Rezeptor innerhalb der Zelle lediglich als Transportprotein dient und das Hormon auf der Chromatinebene an einen Akzeptor, der dann die Aktivierung dieses Chromatinbereichs einleitet, übergibt, da die, bei diesen Experimenten vorhandene, kovalente Ecdysteron-Rezeptorbindung diesen Mechanismus verhindert.

Aus der zusammenfassenden Betrachtung der immunofluoreszenzmikroskopischen Analysen und dem Verhalten des Ecdysteron-Rezeptorkomplexes bei den unterschiedlichsten in vitro Inkubationsbedingungen, läßt sich ableiten, daß der außerordentlich komplexe Vorgang der entwicklungsstadienspezifischen Genregulation im dritten Larvenstadium und frühen Puppenstadium von D. melanogaster nur durch das Zusammenwirken von mindestens drei unterschiedlichen Faktoren erklärbar wird:

- dem Ecdysteron-Rezeptorkomplex, der während des gesamten untersuchten Entwicklungszeitraums vorhanden ist und immer nur positiv regulierend die Genaktivität beeinflußt. Es hat sich kein Beispiel finden lassen, bei dem die Puffauslösung durch

die Komplexbindung verhindert wird, bzw. bei dem die Puffregression durch die Komplexbindung eingeleitet wird.

- einer Gruppe von Proteinen, die an der Genregulation beteiligt ist (negative Rückwärtskontrolle, Autoregulation, positive Vorwärtskontrolle) und zu einem recht frühen Zeitpunkt (ab PS2) unter Ecdysteronkontrolle produziert werden und
- dem Ecdysteron, das nicht nur für die Steroidbeladung des Rezeptors sorgt, sondern durch eine häufig wechselnde Konzentration über Sekundärwirkungen Chromatinbereiche aktivierbar und inaktivierbar macht.

Diese Sekundärwirkungen setzen voraus, daß innerhalb der Zelle weitere Bindungsorte für das Steroidhormon existieren. Durch welchen Effekt diese Bindungsorte jedoch die direkte Genaktivierung durch das Ecdysteron beeinflussen ist ungeklärt. Es ist denkbar, daß entweder das Ionenmileu innerhalb der Zelle verändert wird oder, daß enzymatische Reaktionen ausgelöst werden, die entweder das Chromatin zum Beispiel durch eine Methylierung oder den Ecdysteron-Rezeptorkomplex entwicklungsstadienabhängig verändern.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß zumindest während des frühen dritten Larvenstadiums, vor dem Anstieg der Ecdysteronkonzentration, die Juvenilhormone ebenfalls eine regulatorische Funktion übernehmen und bei dem "Umschalten" der Entwicklung von Intermoltpuffs auf "frühe" Puffs beteiligt sind, bzw. in diesem Stadium (PS1) eine negative Kontrolle über einige Chromatinbereiche, die ecdysteronsensibel sind, ausüben.

Da die Gesamtregulation offensichtlich ein Kaskadensystem ist, an dem mehrere Komponenten beteiligt sind, ist die Analyse von Einzeleinflüssen außerordentlich schwer. Für zukünftige Experimente kristallisieren sich jedoch folgende Fragenkomplexe heraus:

- Existieren in ecdysteronsensiblen Zellen spezifische Hormonbinder, die nicht in den Kern translozieren?
- Verändert sich die Konzentration des Steroid-Rezeptorkomplexes abhängig von der Konzentration des exogenen Steroids?
- Lassen sich, ähnlich wie bei der Meiose von X. laevis - Oocyten mit einem polymergebundenen Ecdysteron morphologische Veränderungen auf dem Zellchromatin einleiten?
- Kann durch die Injektion von isolierten, regulatorischen Proteinen eine Genaktivierung durchgeführt werden?
- Stehen Gene unter direkter Kontrolle der Juvenilhormone und wann hört die Regulation durch diese Hormone auf?

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Roy, A.K. (ed.) (1980) Gene Regulation by Steroid Hormones Springer Verlag, Berlin
2. Yamamoto, K.R. und Alberts, B.M. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 721 - 746
3. Palmiter, R.D., Mulvihill, E.R., Sherherd, J.H. und McKnight, G.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7910 - 7916
4. McKnight, G.S., Pennequin, P. und Schimke, R.T. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8105 - 8110
5. Payvar, R., Wrange, Ö., Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Gustafsson, J.-A. und Yamamoto, K.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6628 - 6632
6. Towle, H., Tsai, M.J., Tsai, S. und O'Mallex, B. (1977) J. Bio. Chem. 252, 2396 - 2404
7. Clever, U. und Karlson, P. (1960) Exp. Cell Res. 20, 623 - 626
8. Clever, U. (1961) Chromosoma (Berl.) 12, 607 - 675
9. Becker, H.J. (1959) Chromosoma (Berl.) 10, 645 - 678
10. Becker, H.J. (1962) Chromosoma (Berl.) 13, 341 - 384
11. Ashburner, M. (1972) in "Results and Problems in Cell Differentiation", Ed.: Beermann, W. Springer Verlag, Berlin, Vol. 4, 101 - 151
12. Zhimulev, I.F. (1974) Chromosoma (Berl.) 46, 59 - 76
13. Ashburner, M. und Berendes, H.D. (1978) in "The Genetics and Biology of Drosophila" Ed.: Ashburner, M. und Wright, T.R.F., London: Academic Press, Vol. 2b, 315 - 395
14. Beermann, W. (1952) Chromosoma (Berl.) 5, 139 - 198
15. Ashburner, M. (1972) Chromosoma (Berl.) 38, 255 - 281
16. Ashburner, M. (1973) Devl. Biol. 35, 47 - 61
17. Ashburner, M. (1974) Devl. Biol. 39, 141 - 157
18. Ashburner, M. und Richards, G.P. (1976) Devl. Biol. 54 241 - 255

19. Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P. und Richards, G. (1974) Cold Spring Harb. Quant. Biol. 38, 655 - 662
20. Gronemeyer, H. und Pongs, O. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2108 - 2112
21. Schaltmann, K. und Pongs, O. (1982) Proc. Natl. Acac. Sci. USA 79, 6 - 10
22. Garen, A., Kauvar, L. und Lepesant, J.-A. (1977) Proc. Natl. Sci. USA 74, 5099 - 5103
23. Grace, T.D.C. (1962) Nature, London, 195, 788 - 789
24. Ashburner, M. (1972) Expl. Cell Res. 71, 433 - 440
25. Saumweber, H., Symmons, P., Kabisch, R., Will, H. und Bonhoeffer, F. (1980) Chromosoma (Berl.) 80, 253 - 275
26. Ashburner, M. (1967) Chromosoma (Berl.) 21, 398 - 428
27. Gronemeyer, H. (1980) Doktorarbeit, Ruhr-Universität Bochum
28. Reum, L., Haustein, D. und Koolman, J. (1982) in Vorbereitung
29. Köhler, G. und Milstein, C. (1975) Nature, London 256, 495 - 497
30. de St. Groth, S.F. und Schneidegger, D. (1980) J. of Immunological Methods 35, 1 - 21
31. Wenker, D. (1980) Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
32. Korenmann, S.G. (1968) J. Clin. Endocr. Metab. 28, 127 - 130
33. Beato, M. und Feigelson, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7890 - 7896
34. Setow, R. und Doyle, B (1957) Biochim. Biophys. Acta 24, 27 - 41
35. Hazato, T. und Murayama, A. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 488 - 493
36. Silver, L.M. und Elgin, S.C.R. (1978) in "The Cell Nucleus" Ed.: Busch, H. London: Academic Press, Vol. 5, 215 - 262
37. Handbook of Experimental Immunology, Ed. Weir, D.M. (1973) Blackwell, Oxford

38. Ashburner, M. (1970) Chromosoma (Berl.) 31, 356 - 376
39. Richards, G. (1981) Mol. Cell. Endocrinology 21, 181 - 197
40. Maurer, P.H. und Callahan, H.J. (1980) in "Methods in Enzymology", Vol. 70, 49 - 70
41. Becker, H.J. (1959) Chromosoma (Berl.) 10, 654 - 678
42. Richards, G. (1976) Devl. Biol. 54, 256 - 263
43. Richards, G. (1976) Devl. Biol. 54, 264 - 275
44. Riddiford, L.M. und Truman, J.W. (1978) in "Biochemistry of Insects" Ed.: Rockstein, M. New York: Academic Press, 308 - 357
45. Joly, P. (1968) Endocrinologie des Insectes, Masson & Cie, Paris, 1 - 344
46. Riddiford, L.M. (1980) Ann. Rev. Physiol. 42, 511 - 528
47. Hoffmann, J.A. (ed.) (1980) "Progress In Ecdysone Research" Developments in Endocrinology Vol. 7, Elsevier/North-Holland, Amsterdam
48. Klages, G. und Emmerich, H. (1980) Nature London, 286, 282 - 285
49. Chang, E.S., Coudron, T.A., Bruce, M.J., Sage, B.A., O'Connor, J.D. und Law, J.H. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4657 - 4661
50. Riddiford. L.M. und Mitsui, T. (1978) in "Comparative endocrinology" Ed.: Gaillard, P.J. und Boer, H.H. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 519
51. Riddiford, L.M., Chen, A.C., Graves, B.J. und Curtis, A.C. (1981) Insect. Biochem. 11, 121 - 127
52. Sridhara, S., Nowock, J. und Gilbert, L.I. (1978) in "Biochemistry and mode of action of hormones" II Ed.: Rickenberg, H.V. Intern. Rev. Biochem. 20, 133 - 188
53. Bonner, J.J. und Pardue, M.L. (1977) Cell 12, 226 - 235
54. Kiely, M.L. und Riddiford, L.M. (1980) Amer. Zool. 20, 877

55. Pöting, A. (1981) Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
56. Richards, G. (1980) in "Progress In Ecdysone Research" Ed.: Hoffmann, J.A. Developments in Endocrinology Vol. 7, 363 - 378
57. Tissièrres, A., Mitchell, H.K. und Tracy, U.M. (1974) J. Mol. Biol. 84, 389 - 398
58. Lepesant, J.A., Lepesant, J.K. und Garen, A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5570 - 5574
59. Couderc, J.L. und Dastugue, B. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 173 - 181
60. Riddiford, L.M. (1981) Amer. Zool. 21, 751 - 762
61. Postlethwait, J.H. und Handler, A.M. (1979) J. Insect. Physiol. 25, 455 - 460
62. Kress, H. (1981) Naturwissenschaften 68, 28 - 33
63. Tomkin, G.M., Gelehrter, T.D., Granner, D., Martin, D., Samuels, H.H. und Thompson, E.B. (1969) Science 166, 1474 - 1480
64. Beaulieu, E.-E., Godeau, F., Schorderet, M. und Schorderet-Slatkine, S. (1978) Nature London, 275, 593 - 598
65. Wasserman, W.J., Pinto, L.H., O'Connor, C.M. und Smith, D.L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1534 - 1536
66. Cartaud, A. und Ozon, R. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9404 - 9408
67. Kroeger, H. (1963) Nature London, 200, 1234 - 1235
68. Kroeger, H. (1977) Mol. Cell. Endocrinol. 7, 105 - 110
69. Kroeger, H. (1966) Exp. Cell Res. 41, 64 - 80
70. Ashburner, M. und Cherbas, P. (1976) Mol. Cell. Endocrinol. 5, 89 - 107
71. Berendes, H.D., Alonso, C., Helmsing, P.J., Leenders, H.J. und Derksen, J. (1974) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 38, 645 - 654
72. Ashburner, M. (1969) Chromosoma (Berl.) 27, 47 - 63
73. Jamrich, M., Greenleaf, A.L. und Bautz, E.K.F. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2079 - 2083

74. Silver, L.M. und Elgin, S.C.R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci USA 73, 423 - 427
75. Alfageme, C.R., Rudkin, G.I. und Cohen, L.H. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2038 - 2042
76. Emmerich, H. (1969) Exp. Cell Res. 58, 261 - 270
77. Taylor, C.A., Smith, H.E. und Danzo, B.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 234 - 238
78. Dure, L.S., Schrader, W.T. und O'Malley, B.W. (1980) Nature London, 283, 784 - 786
79. Westphal, H.M., Fleischmann, G. und Beato, M. (1981) Eur. J. Biochem. 119, 101 - 106
80. Nordeen, S.K., Lan, N.C., Showers, M.O. und Baxter, J.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10503 - 10508
81. Hoschützky, H. (1981) Diplomarbeit Ruhr-Universität Bochum
82. Korge, G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 72, 4550 - 4554
83. Akam, M.E., Roberts, D.B., Richards, G.P. und Ashburner, M. (1978) Cell 13, 215 - 225
84. Belyaeva, E.S., Vlassova, I.E., Biyasheva, Z.M., Kakpakov, V.T., Richards, G. und Zhimulev, I.F. (1981) Chromosoma (Berl.) 84, 207 - 219
85. Walker, V.K. und Ashburner, M. (1981) Cell 26, 269 - 277
86. Johnson, A.D., Poteete, A.R., Lauer, G., Sauer, R.T., Ackers, G.K. und Ptashne, M. Nature London, 294, 217 - 223
87. Cohen, P. (1982) Nature London, 296, 613 - 620

LEBENSLAUF

3. 1. 1952	geboren in 4630 Bochum
1958 - 1962	Besuch der Albert Martmöller Schule in 581 Witten
1962 - 1971	Besuch des mathematisch- naturwissenschaftlichen Jungengymnasiums in 581 Witten
24. 5. 1971	Abitur am Jungengymnasium Witten
1971 - 1977	Chemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
1977 - 1978	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Pongs
1978 - 1982	Promotion am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Pongs
12. 6. 1981	Heirat mit Barbara Dockhorn

DER DRUCKER - Buscheystraße 138 - 4630 Bochum - Tel. (02 34) 70 41 16